

ALMA MATER STUDIORUM UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

**Corso di Laurea Magistrale in
BIOLOGIA MARINA**

**Attività catalitica ed espressione genica di enzimi
antiossidanti nei mitili, *Mytilus galloprovincialis* esposti ai
farmaci fluoxetina e propranololo ed alla loro miscela.**

Relatore

Prof.ssa Elena Fabbri

Presentata da

Lucia De Luca

Correlatore

Dott.ssa Silvia Franzellitti

(III sessione)

Anno Accademico 2010/2011

“Per chi ci ha messo il cuore e
altrettanto cuore non ha trovato,
per chi si è sbagliato e ci ha messo
troppo sale, per chi non avrà pace
finché non riuscirà a scoprire in
quale maledetto barattolo hanno
nascosto lo zucchero, per chi rischia
di annegare nella piccola alluvione
delle sue lacrime. Siamo qui con voi
e, nonostante tutto, come voi siamo
vivi.” Giorgio Faletti

1.INTRODUZIONE	1
1.1 IL PROBLEMA DEI FARMACI COME CONTAMINANTI AMBIENTALI	1
1.2 CONTAMINAZIONE DA FARMACI.....	3
1.2.1 I farmaci e la interazione con gli enzimi antiossidanti	4
1.3 METABOLISMO DEGLI XENOBIOTICI	6
1.3.1 Enzimi antiossidanti : GST-CAT-SOD.....	9
1.4 STRESS OSSIDATIVO	12
1.5 PEROSSIDAZIONE LIPIDICA	14
1.6 DANNO AL DNA	15
2. SCOPO DELLA TESI.....	17
3.MATERIALI E METODI.....	19
3.1 IL MITILO MEDITERRANEO (MYTILUS GALLOPROVINCIALIS)	19
3.1.1. Il mitilo come organismo sentinella.....	20
3.2. ESPOSIZIONE DEI MITILI AI FARMACI FLUOXETINA E PROPRANOLOLO	22
3.2.1. Fluoxetina.....	23
3.2.2. Propranololo.....	24
3.3. ESTRAZIONE RNA	26
3.3.1. Retrotrascrizione dell'RNA.....	26
3.4. LA PCR SEMI-QUANTITATIVA.....	27
4.RISULTATI	30
4.1. EFFETTO DELL'ESPOSIZIONE IN VIVO DEI MITILI AI FARMACI FLUOXETINA E PROPRANOLOLO	30
4.1.1. Espressione del gene glutatione s-transferasi a cinque concentrazioni di propranololo.	33
4.1.2. Espressione del gene superossido dismutasi a cinque concentrazioni di fluoxetina.	34
4.1.3. Espressione del gene superossido dismutasi a cinque concentrazioni di propranololo differenti.....	35
4.2. EFFETTO DELL'ESPOSIZIONE IN VIVO DEI MITILI ALLA MISCELA DI FLUOXETINA E PROPRANOLOLO (FX+PROP)	36
5. DISCUSSIONI E CONCLUSIONI	39
6.BIBLIOGRAFIA	ERRORE. IL SEGNALE NON È DEFINITO.
7.RINGRAZIAMENTI	64

1.INTRODUZIONE

1.1 Il problema dei farmaci come contaminanti ambientali

I prodotti farmaceutici sono sempre più utilizzati nella medicina umana e veterinaria, e sono capaci di resistere ai processi del trattamento delle acque, entrando così negli ecosistemi acquatici (Santos *et al.*, 2010). Il loro consumo è notevole, basti pensare all'elevato uso che se ne fa giornalmente di antinfiammatori non steroidei-analgesici, antibiotici, regolatori di lipidi, beta bloccanti, steroidi ed ormoni correlati (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Fent *et al.*, 2006; Daughton e Ternes, 1999).

A causa della loro incompleta eliminazione negli impianti di depurazione, residui di farmaci e loro metaboliti si riversano nelle acque superficiali (Fent *et al.*, 2006; Richardson e Bowron, 1985).

Negli ultimi anni, la nostra conoscenza sulla presenza ambientale dei prodotti farmaceutici è aumentata grazie alle nuove tecniche analitiche in grado di rilevare composti polari in quantità minime, ma le informazioni sulla loro dispersione nell'ambiente sono ancora limitate (Fent *et al.*, 2006; Kolpin *et al.*, 2002). I prodotti farmaceutici sono stati rilevati in molti paesi negli effluenti degli impianti di trattamento delle acque reflue, nelle acque superficiali, in acqua di mare, e nelle acque sotterranee a concentrazioni che vanno dai microgrammi ai nanogrammi per litro (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Fent *et al.*, 2006; Daughton e Ternes, 1999). E' documentata anche la presenza nelle acque potabili (Daughton, 2010).

Nel trattamento delle acque reflue, due sono i processi di eliminazione generalmente importanti: assorbimento di solidi sospesi (fanghi di depurazione) e biodegradazione. L'assorbimento dipende sia dalle interazioni idrofobiche ed elettrostatiche dei farmaci con particelle e microorganismi. Acidi farmaceutici come il FANS, acido acetilsalicilico, ibuprofene, fenoprofen, ketoprofene, naprossene, diclofenac e

indometacina valori che hanno pKa che vanno da 4,9 a 4,1, così come l'acido clofibrato, bezafibrato (pKa 3,6) e gemfibrozil hanno poco tendenza di assorbimento per i fanghi.

Il comportamento e il destino dei farmaci e la loro metaboliti per l'ambiente acquatico non è ben conosciuto. La bassa volatilità dei farmaci indica che la distribuzione nell'ambiente si verifica principalmente attraverso il trasporto nelle matrici acquose, tuttavia la diffusione nello spessore del suolo rende possibile il raggiungimento della falda acquifera; inoltre è possibile anche il trasferimento all'interno della catena trofica seppure non del tutto dimostrato (Fent *et al.*, 2006). Comunque, una dimostrazione che questo può accadere, è rappresentata dall'antinfiammatorio diclofenac, che se presente nelle prede degli avvoltoi passa ad essi causando gravi effetti renali (Oaks *et al.*, 2004).

Sono disponibili molti dati concernenti le concentrazioni dei farmaci nelle varie matrici acquatiche; inoltre sono disponibili i risultati di molti esperimenti che hanno valutato la tossicità acuta dei farmaci per le alghe, i crostacei o altri organismi tipicamente usati nei test ecotossicologici. Questi test hanno concluso che le concentrazioni a cui i farmaci sono presenti in ambiente sono troppo basse per avere effetti sugli organismi. Tuttavia, le evidenze ottenute a larga scala concernenti i farmaci impiegati come ormoni sintetici (ad es. i farmaci contenuti nella pillola anticoncezionale, hanno spinto la comunità scientifica ad andare oltre, e ottenere informazioni circa la tossicità cronica, o di bioaccumulo dei prodotti nel biota o nelle catene alimentari. Questi studi hanno fornito risultati molto interessanti ed appare evidente che, seppur non letali, i farmaci già alle basse concentrazioni con cui sono presenti in ambiente possono avere effetti sul biota .

Occorre tenere presente che, rispetto ai comuni inquinanti che derivano da processi industriali, i farmaci sono stati progettati per avere effetti sugli organismi e una specifica modalità di azione svolta a concentrazioni molto basse. Invece, assunzioni a dosi maggiori possono avere effetti collaterali che ci si attende possano essere causati anche negli organismi acquatici. I meccanismi d'azione dei prodotti farmaceutici sono noti a livello degli organismi a cui sono destinati, ma non altrettanto negli organismi non bersaglio che abitano le acque interne o costiere (Santos *et al.*, 2010). Questi potrebbero essere molto differenti, con effetti meno intensi ma anche più gravi data la

continua esposizione. Infatti, i farmaci vengono continuamente riversati nelle acque e sono da considerare quindi composti pseudo-persistenti. Sono già pubblicati vari studi inerenti i meccanismi con cui alcuni farmaci agiscono sui pesci (Santos *et al.*, 2010) o sui molluschi (es. Martin-Diaz *et al.*, 2009, Franzellitti *et al.*, 2011), e i risultati ottenuti sono importanti per comprendere quali farmaci ambientali interferiscano con la fisiologia degli organismi con effetti pericolosi per la vita degli organismi stessi o la loro progenie (Christen *et al.*, 2010).

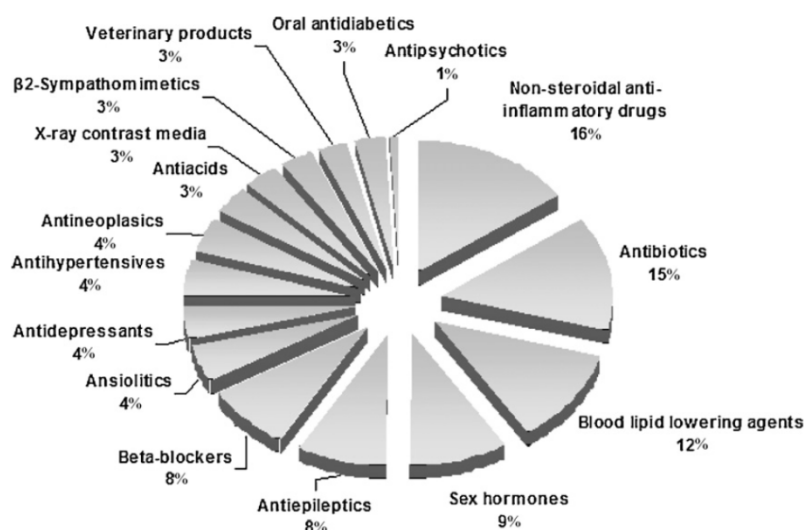


Fig 1.1 Classi di farmaci rilevati nell'ambiente, espressi in percentuale relativa.

1.2 Contaminazione da farmaci

Diversi farmaci, alcuni dei quali sono ormoni artificiali come ad es. l'etinilestradiolo, vanno ad influenzare il sistema endocrino. In questo caso vengono definiti interferenti endocrini, sostanze esogene o miscele, che alterano le funzionalità del sistema endocrino causando effetti avversi sulla salute di un organismo, oppure della sua progenie (European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife, Weybridge, 1996). Tra i distruttori endocrini più importanti ricordiamo il dietilstilbestrolo (DES), un antiabortivo che provoca il cancro nell'apparato genitale femminile, il talidomide, un potente antinausea che veniva prescritto nelle donne in

stato di gravidanza nel primo dopo guerra, l'etinilestradiolo che è direttamente un ormone contenuto nella pillola anticoncezionale e che è stato sono stati associati al fenomeno di intersessualità nei pesci presenti nei fiumi che ricevono alte concentrazioni di farmaci presenti negli effluenti (Desbrow *et al.*, 1998;. Routledge *et al.*, 1998). Pesci maschi con caratteristiche femminili spesso trovati vicino agli scarichi municipali, hanno organi sessuali alterati che producono pochi spermatozoi mobili, hanno livelli significativi di estrogeni nel sangue, e inducano la produzione di vitellogenina nel fegato (Filby *et al.*, 2007; Kloas *et al.*, 2009). In particolare, il levonorgestrel (LNG), uno steroide sintetico utilizzato come contraccettivo, è stata rilevata negli scarichi urbani nelle acque superficiali in superficie, sotterranee e nei sedimenti (De Alda *et al.*, 2002;. Vulliet *et al.*, 2007, 2008). Sono presenti anche femmine mascolinizzate, soprattutto in zone limitrofe alle aziende di trattamento della carta. Queste hanno organi genitali maschili e comportamenti maschili. Il cambiamento sessuale è solo superficiale dato che comunque hanno ovari e possono rilasciare uova o feti vivi (ovovivipari).

1.2.1 I farmaci e la interazione con gli enzimi antiossidanti

Una variabilità stagionale delle concentrazioni di metalli in tracce ed enzimi antiossidanti è stata osservata in branchie e ghiandola digestiva del mitilo mediterraneo *Mytilus galloprovincialis* in popolazioni inquinate e non inquinate. Metalli in tracce (As, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn) esibivano, in entrambi gli organi, valori massimi in inverno-inizio primavera seguito da una progressiva diminuzione durante l'estate. Mentre nelle branchie questo effetto riflette probabilmente una diversa biodisponibilità dei metalli, nella ghiandola digestiva è influenzato principalmente dalla progressiva infiltrazione degli organi quali gonadi durante la gametogenesi. I metalli, così come altri inquinanti, sono noti per influenzare gli enzimi antiossidanti.

Gli effetti ossidanti sono probabilmente i più importanti osservati anche a livello umano quando il livello dei farmaci assunti è elevato; per esempio i pazienti che assumono

farmaco antiepilettico carbamazepina che viene somministrato a dosi di milligrammi al giorno sono sottoposti a continui controlli per gli effetti ossidanti; effetti collaterali come un aumento del glutathione e della glutathione perossidasi, citotossicità sulle membrane cellulari, rigonfiamento dei neuroni e tossicità epatica (e.g. Suwalsky *et al.*, 2006). La reattività redox dei farmaci è peraltro alla base dei loro effetti terapeutici, e la induzione di meccanismi antiossidanti della carbamazepina è stato osservato anche in invertebrati acquatici (Quinn *et al.*, 2004).

Anche la fluoxetina (FLX) ha effetti sul sistema antiossidante nei topi (Djordjevic *et al.*, 2011). Lo stress ossidativo è caratterizzato da uno sbilanciamento quando un aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) quali per esempio l'anione superossido, l'acqua ossigenata e i radicali idrossilici supera le difese antiossidanti degli organismi. Uno dei meccanismi coinvolge la induzione di enzimi antiossidanti (Livingstone, 2001; Regoli *et al.*, 2002; Valavanidis *et al.*, 2006). Inoltre anche l'enzima di fase II glutathione S-tranferasi (GST) promuove la detossificazione, noto per catalizzare reazioni di coniugazione tra il glutathione e i composti xenobiotici (Regoli e Principato, 1995). Quando il sistema antiossidante è compromesso da un eccesso di ROS, ha luogo la perossidazione lipidica che danneggia la membrana fosfolipidica (Valavanidis *et al.*, 2006). La fluttuazione dell'attività degli enzimi antiossidanti in parallelo con l'aumento della perossidazione lipidica dovuta alla esposizione ai contaminanti è stata usata con successo come biomarker nei mitili (Di Giulio *et al.*, 1989; Livingstone 1993, Winston e Di Giulio 1991).

In generale, i mitili sono ampiamente utilizzati come bioindicatori di inquinamento di metalli pesanti nelle zone costiere in quanto loro sono note per accumulare questi elementi, fornendo una informazione integrata della contaminazione ambientale. A questo proposito, lo stress ossidativo è un percorso comune di tossicità indotta da una classe di inquinanti la cui produzione è aumentata da specie reattive dell'ossigeno. La protezione contro la tossicità dei radicali ossigenati nei confronti dei target cellulari è offerta da un sistema complesso di difesa di entrambi spazzini a basso peso molecolare e enzimi antiossidanti. Variazioni di difese antiossidanti, come il contenuto di

glutathione, l'attività del glutathione dipendente, ed enzimi antiossidanti, sono stati spesso proposti come contaminanti mediati nello stress ossidativo nei diversi organismi marini.

Dal momento che le branchie e la ghiandola digestiva sono anche i principali organi bersaglio per diversi inquinanti, questi tessuti sono stati scelti per confrontare i differenti effetti della variazione del peso stagionale sulle concentrazioni dei metalli. Gli stessi organi sono stati utilizzati anche per indagare la difesa antiossidante delle cozze. Tra queste, la concentrazione di glutathione totale e l'attività di alcune glutathione-dipendenti e di enzimi antiossidanti: il glutathione S-transferasi (coinvolto nella reazione di coniugazione del GSH con i centri elettrofilici di diversi composti di xenobiotici), la catalasi (riduce il perossido d'idrogeno ad acqua), la superossido dismutasi (converte l'anione radicale superossido in perossido d'idrogeno).

1.3 Metabolismo degli xenobiotici

L'organismo considera il farmaco una sostanza estranea e tende perciò ad eliminarla. Affinché tali sostanze possano penetrare nel nostro organismo devono avere delle caratteristiche di liposolubilità e non ionizzazione. Allo stesso tempo, però, se tali caratteristiche dovessero permanere, il farmaco resterebbe nell'organismo e non sarebbe eliminato. L'organismo cerca tramite processi di biotrasformazione (o metabolizzazione) di trasformare le caratteristiche del farmaco in modo da renderlo:

- Più ionizzato, quindi meno liposolubile, in modo che possa andare incontro a processi di eliminazione ed escrezione a livello dei vari organi escretori.
- Meno affine per le proteine plasmatiche e tissutali.

Questo discorso è molto importante per i farmaci liposolubili mentre quelli idrosolubili, di solito, vengono escreti immodificati per via renale. La biotrasformazione è un'attività che si ha principalmente a livello del fegato; tuttavia tale attività può avvenire a livello di parecchi altri distretti e organi sebbene con importanza inferiore (apparato gastroenterico, reni, polmoni, plasma). Essa dipende dal flusso ematico epatico e

dall'attività degli enzimi metabolizzanti. I processi di biotrasformazione si dividono in 2 fasi:

Reazioni di fase I (o non sintetiche): sono processi di attivazione del farmaco rappresentati da ossidazione, riduzione, deaminazione ossidativa, idrolisi che servono per introdurre dei gruppi polari idrofili o a smascherarli se sono già presenti nella molecola di partenza. I sistemi enzimatici coinvolti nelle reazioni di I fase sono localizzati principalmente nel reticolo endoplasmatico degli epatociti in cui il sistema microsomiale citocromo P450 (CYP450) è responsabile delle reazioni di ossidazione. Tale citocromo è un enzima che riduce un ossigeno sul substrato, dando origine alle reazioni di ossidazione, idrolisi ed altre forme. I citocromo P450 appartengono alle monossigenasi “esterne” (Bernhardt, 2004). Questo implica che hanno bisogno di un donatore di elettroni esterno, che trasferisce gli elettroni necessari per l'attivazione dell'ossigeno e il substrato per l'idrossilazione. Esistono due classi di citocromo P450, mitocondriali e microsomiali. I citocromi P450 sono microsomiali, legati alla membrana e accettano elettroni da una NADPH-citocromo P450 reduttasi microsomiale, contenente FAD e FMN. Quest'ultimo P450 sistema costituito da una catena polipeptidica con due domini diversi, uno contenente un'emoproteina e l'altra contenente una FAD-reduttasi tramite ferro-zolfo proteine del tipo 2Fe-2S. I citocromi P450 sono localizzati sulla membrana mitocondriale interna, mentre il [2Fe-2S] proteine, chiamato adrenodossina nel caso di steroide surrenale sistemi idrossilasi, è una proteina solubile della matrice. La FAD contenente reduttasi, adrenodossina reduttasi (ADR), è associato alla membrana mitocondriale interna. Come reduttasi microsomiale, la ferredossina mitocondriale deve anche fornire elettroni a diversi citocromi P450. Dai dati disponibili, un servizio navetta modello è favorita, in cui la ferredossina ossidata interagisce con la prima reduttasi ferredossina a subire riduzione con la formazione di un $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$ zolfo ferro **cluster**. Il complesso enzima-substrato ridotto (Fe^{2+}) si lega all'ossigeno molecolare (O_2) e viene ridotto ulteriormente da un secondo elettrone (presumibilmente donato dal NADH). Un atomo di O_2 si riduce ad H_2O mentre l'altro viene incorporato nel substrato producendo XOH , un idrossilato. Il complesso enzima-substrato-ossigeno si divide quindi in substrato ossidato, acqua e nella forma ossidata

dell'enzima. L'interazione dei citocromi P450 con il loro corrispondente donatori di elettroni è un requisito necessario del ciclo catalitico. La sua specificità garantisce una sufficiente velocità di reazione di catalisi e così una discriminazione tra i diversi potenziali donatori e accettori di elettroni per proteggere il sistema da reazioni **shunt** (Grinberg *et al.*, 2000). Esistono degli isoenzimi responsabili di specifiche reazioni, di cui le più importanti in relazione al metabolismo dei farmaci sono: CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2 e CYP2E1; CYP3A4 è la principale isoforma ed è espresso anche nella parete intestinale determinando in alcuni casi una riduzione del farmaco realmente disponibile per l'effetto farmacologico. Gli isoenzimi non sono presenti in tutti gli organismi ma ci sono delle reazioni presenti solo in alcune specie animali. Il corredo dei citocromi è sottoposto a controllo genetico e possono esistere consistenti differenze nella capacità metabolica in relazione alla razza ed allo stato di metabolizzazione lento o rapido.

L'attività di tali enzimi in un paziente, inoltre, può essere aumentata o diminuita per effetto dell'azione di altre sostanze che sono contemporaneamente assunte a scopo terapeutico o voluttuario e che si comportano, rispettivamente, da induttori o inibitori enzimatici. Gli induttori enzimatici agiscono aumentando la capacità metabolica di questi citocromi e, pertanto, altri farmaci assunti contemporaneamente, che siano substrati di questi citocromi, saranno metabolizzati più velocemente cosicché sarà necessario aumentare la dose del farmaco al fine di garantire l'efficacia terapeutica. Gli inibitori enzimatici si legano in modo irreversibile ai citocromi impendendone l'attività cosicché la velocità di eliminazione del farmaco viene ridotta con conseguente accumulo e rischio di tossicità; ne consegue una riduzione della dose da somministrare.

Reazioni di II fase (o sintetiche): sono processi di coniugazione in cui si ha il legame del farmaco di partenza, o del metabolita derivato dai processi della prima fase, con dei substrati endogeni. I substrati endogeni possono essere acidi come acido glucuronico, acido solforico, acido acetico, acido benzoico, ecc.; possono essere aminoacidi come: glicina, cisteina, glutammina, serina, lisina; anche il glutathione è un substrato endogeno. Queste reazioni di coniugazione possono essere considerate dei processi di detossificazione, dato che tramite esse si ottengono dei metaboliti meno attivi e più

idrosolubili. I sistemi enzimatici coinvolti nelle reazioni di biotrasformazione di II fase sono generalmente citosolici.

C'è una specificità per quanto riguarda questi accoppiamenti dato che la coniugazione con l'acido glucuronico può avvenire tramite l'uridil-glucosio-glucuronil-transferasi solo su gruppi quali OH, COOH, SH, NH₂.

La metilazione avviene su gruppi come OH, NH₂; la coniugazione con amminoacidi avviene solo su gruppi COOH; la coniugazione con acidi grassi solo su OH. Ci deve essere la presenza di un gruppo funzionale, l'enzima che permette la coniugazione e la disponibilità del substrato endogeno. L'ultimo elemento può influenzare la quantità di coniugato che si può formare.

1.3.1 Enzimi antiossidanti : GST-CAT-SOD

Nei sistemi biologici, i radicali liberi dell'ossigeno o ROS (Reactive Oxygen Species) vengono generati ed eliminati continuamente (Di Giulio *et al.*, 1989; Halliwell and Gutteridge, 1999; Winzer, 2001). Essi vengono prodotti sia attraverso una serie di reazioni catalizzate da enzimi che attraverso reazioni di natura non enzimatica. I ROS inoltre, possono essere prodotti anche in conseguenza di esposizione a radiazioni ionizzanti, xenobiotici, agenti chemioterapici. I ROS vengono definiti comunemente come composti con elevata reattività chimica. I principali ROS sono: O₂⁻ (anione superossido), H₂O₂ (perossido d'idrogeno); •OH (radicale idrossilico); NO (monossido d'azoto). Esistono dei sistemi di difesa contro l'azione dei ROS caratterizzati da una serie di geni che codificano per degli enzimi antiossidanti che sono : la catalasi, la superossido dismutasi, il glutathione perossidasi e il glutathione S-transferasi. Questi enzimi antiossidanti sono anche dei biomarcatori di difesa (Khessiba *et al.*, 2005). La **catalasi** è coinvolto nel sistema di detossificazione della cellula, presente nella matrice dei mitocondri di mammifero (Møller, 2001). La proteina enzimatica è composta da 4 catene polipeptidi che contengono al loro interno 4 gruppi ferrosi capaci di reagire con il perossido d'idrogeno (**Fig. 1.2**).

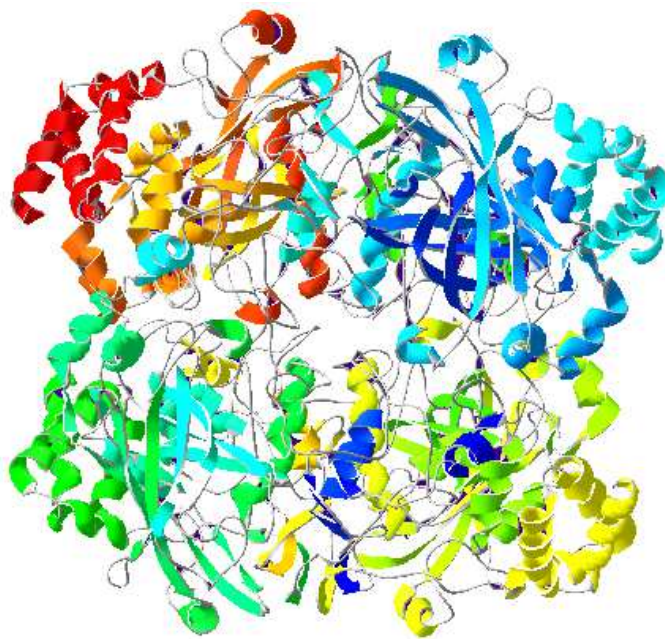


Fig.1.2 Rappresentazione “a nastro” dell’enzima catalasi.

Nei perossisomi, la flavoproteina deidrogenasi che genera il doppio legame trasferisce direttamente gli elettroni all’ossigeno, formando H_2O_2 , il perossido d’idrogeno. Questo forte ossidante è potenzialmente dannoso, ed è in grado di recare danno ai lipidi della membrana e viene immediatamente scisso in H_2O e O_2 dalla catalasi. Nella cellula, i ROS oltre che nei mitocondri, vengono generati anche in altri compartimenti e da molti enzimi (Viarengo *et al.*, 2007). Il radicale libero superossido O_2^- che si genera è molto reattivo e può danneggiare gli enzimi, i lipidi di membrana e gli acidi nucleici. Per evitare i danni ossidativi causati da O_2^- le cellule hanno diverse forme dell’enzima **superossido dismutasi**, che catalizza la reazione : $2 \text{O}_2^- + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$. Le superossido dismutasi (SOD) sono proteine che operano come “spazzini” dei radicali liberi, come enzimi che catalizzano la reazione di dismutazione di radicali superossidi reattivi in perossido di idrogeno. L’enzima SOD2 si trova nei mitocondri e gioca un ruolo importante nella resistenza agli agenti ossidanti da parte degli organi vitali (**Fig. 1.3**)



Fig.1.3 Rappresentazione a “nastro” dell’enzima superossido dismutasi.

Il perossido d’idrogeno che si genera nella reazione catalizzata dalla SOD è degradato e reso inoffensivo dall’azione della glutathione reduttasi. Questo enzima è particolare per la presenza di un residuo di selenio-cisteina, in cui un atomo di selenio rimpiazza l’atomo di zolfo normalmente presente nel gruppo tiolico della catena laterale. La glutathione reduttasi ricicla il glutathione ossidato nella sua forma ridotta, utilizzando gli elettroni provenienti da NADPH formato dalla nicotinammide nucleotide transidrogenasi. Il glutathione ridotto serve anche a mantenere i gruppi sulfidrilici allo stato ridotto, evitando alcuni degli effetti deleteri dello stress ossidativo (Leningher *et al.*, 2006).

La **glutathione s-transferasi** è un enzima detossificante che catalizza la coniugazione di varie molecole tossiche con il glutathione rendendole meno reattive e più facilmente eliminabili dall’organismo e protegge le macromolecole cellulari dal danno causato da agenti citotossici e cancerogeni (**Fig. 1.4**). L’enzima GSTP1 si trova in abbondanza nei diversi tessuti epiteliali umani ed è la più abbondante isoforma nel polmone, quindi il GSTP1 può avere una notevole importanza per la detossificazione di cancerogeni inalati incluso il benzopirene, di cui una fonte massiva sono le sigarette. Inoltre è coinvolto nella reazione di coniugazione del GSH con i centri elettrofilici di diversi composti di

xenobiotici, come sopra citato. Il mancato funzionamento di questa classe di enzimi antiossidanti può causare diversi danni alla cellula quali danno al DNA, ossidazione delle proteine, danno alle membrane ed perossidazione lipidica.

Gli effetti tossici degli inquinanti spesso dipendono dalla loro capacità di aumentare le specie reattive dell'ossigeno (ROS) nei diversi compartimenti della cellula. Questo avviene tramite l'attivazione di processi che portano alla loro sintesi o tramite un'azione indiretta sugli enzimi di detossificazione diminuendo così le difese cellulari. Quando il livello di produzione dei ROS supera lo "scudo" antiossidante (catalasi, SOD, GST) presente nel citoplasma, i ROS entrano nei lisosomi dove queste difese non sono più presenti e le cellule subiscono lo stress ossidativo che causa la perossidazione lipidica sulle membrane lisosomiali destabilizzandole (Viarengo, 1989; Terman and Brunk, 2004).

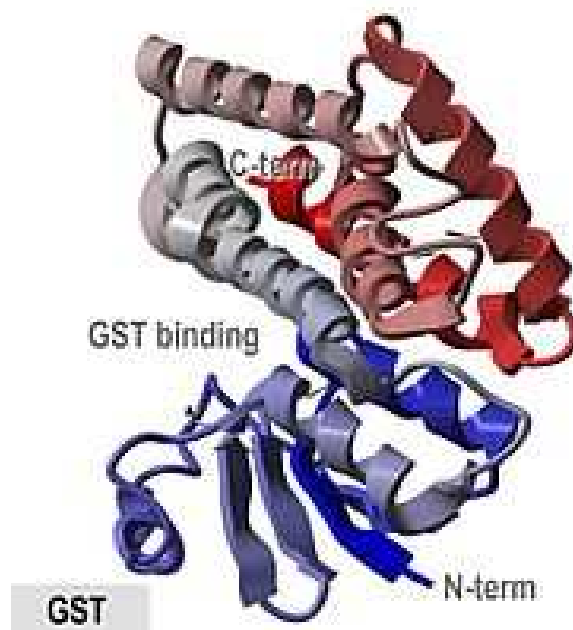


Fig.1.4. Rappresentazione a "nastro" dell'enzima glutathione S-transferasi.

1.4 Stress ossidativo

Paradossalmente proprio l'ossigeno, indispensabile per mantenerci in vita, è anche la più importante fonte di produzione di radicali liberi. Questi sono infatti composti da

ossigeno (lo stesso che respiriamo), che si lega ad altri elementi presenti nel nostro corpo dando vita a particolari molecole, che reagiscono con le diverse strutture dell'organismo (Fig. 1.5).

La creazione dei radicali liberi si verifica nei mitocondri, strutture in cui l'ossigeno viene utilizzato per produrre energia biodisponibile. Parte di quello in eccesso va infatti a formare le molecole nocive, che possono contenerne uno o più atomi. La loro naturale reattività fa in modo che si leghino a molte delle "strutture" biochimiche e cellulari fondamentali, quali il DNA e gli stessi mitocondri, danneggiandole. Un potenziale freno è il raggiungimento di uno stato di equilibrio tra produzione endogena di radicali liberi e la loro neutralizzazione da parte del sistema anti-ossidante dell'organismo. Il nostro sistema di difesa dai radicali liberi si basa su meccanismi antiossidanti enzimatici, già descritti in precedenza, e non-enzimatici. Tra le sostanze non enzimatiche citiamo la Vitamina E, la Vitamina C, i carotenoidi, i polifenoli, le antocianine. In condizioni fisiologiche normali, l'equilibrio è mantenuto in modo naturale. E' comprovato che molte delle malattie più comuni legate all'invecchiamento, quali arteriosclerosi, cataratta, morbo di Alzheimer, morbo di Parkinson, sono legate alla prevalenza dei sistemi ossidativi su quelli antiossidanti (Winston and Di Giulio, 1991; Goeptar *et al.*, 1995).

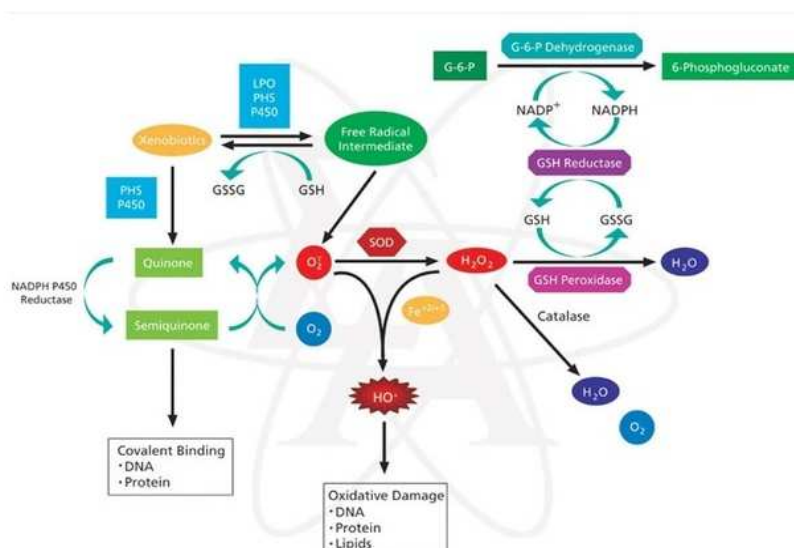


Fig 1.5 Schema delle principali reazioni che hanno luogo durante lo stress ossidativo.

1.5 Perossidazione lipidica

La più conosciuta delle reazioni a catena a cui partecipano i radicali liberi è la perossidazione lipidica. Questa reazione avviene quando gli elementi lipidici costitutivi delle membrane cellulari e delle guaine mieliniche vengono attaccati dai radicali liberi, ovvero molecole altamente reagenti carenti di un elettrone. I radicali liberi si formano in eccesso durante alcuni processi patologici, su base infiammatoria, di tipo ischemico, neurodegenerativo o traumatico. In queste condizioni, i lipidi contenenti acidi grassi insaturi vengono ossidati dai radicali liberi o direttamente dall'ossigeno molecolare, e innescano un meccanismo a cascata caratterizzato dal sequestro di elettroni dalle molecole contigue, coinvolgendo in queste reazioni anche le proteine e gli acidi nucleici. Se i radicali liberi delle catene non vengono inattivati, la loro reattività chimica può danneggiare tutti i tipi di macromolecole cellulari, con effetti che sono risultati implicati nella eziologia di malattie degenerative. I prodotti che si accumulano nei lisosomi, che sono degli organelli deputati alla degradazione ed alla digestione di molecole estranee e macromolecole ingerite dalla cellula via endocitosi così come di macromolecole endogene, sono le lipofuscine. Queste sono dei granuli che derivano dall'ossidazione di lipidi e proteine, il loro accumulo all'interno dei lisosomi negli epatociti di ghiandole digestive dei molluschi, è indice di stress ossidativo nelle cellule (Viarengo and Nott, 1993). L'accumulo di lipofuscine nel sistema vacuolare lisosomiale di solito è considerato un indice di stress cellulare. La non degradabilità delle lipofuscine è dovuta essenzialmente alla presenza di peptidi legati a ponte da aldeidi in strutture simili alle materie plastiche. Inoltre, i dati della letteratura hanno chiarito che i granuli di lipofuscine possono intrappolare cationi inorganici come Cu, Zn, Fe, Mg, Mn. È stato anche dimostrato che le metallotioneine sono rapidamente sequestrate nei lisosomi, dove tendono a polimerizzare attraverso legami disolfuro e vengono poi eliminati come metalli contenenti corpi residui per esocitosi (Viarengo *et al.*, 1985a). Pertanto l'attività dei lisosomi (come accumulo di prodotti di perossidazione e metallotioneina) costituisce anche un interessante componente del sistema antiossidante,

essendo in grado di rimuovere dal citosol tali cationi (Fe e Cu), che nella reazione di Fenton danno luogo alla formazione di radicali idrossilici.

Anche i livelli di malondialdeide (MDA) vengono utilizzati per stimare l'entità della perossidazione lipidica subita dalle cellule. Questo è un prodotto intermedio della perossidazione lipidica che viene solitamente degradato velocemente (Esterbauer, 1985) mentre le lipofuscine rappresentano il prodotto finale della perossidazione lipidica e il loro accumulo, facilmente rilevabile nelle cellule degli organismi stressati, tiene conto dell'intero processo di per ossidazione (Fig. 1.6).

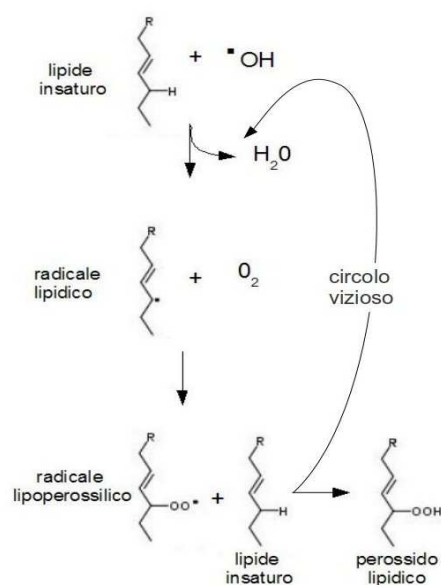


Fig 1.6 Schema raffigurante la perossidazione lipidica.

1.6 Danno al DNA

Il DNA rappresenta un altro bersaglio dei radicali liberi, nel momento in cui il sistema di funzionamento degli enzimi antiossidanti smette di funzionare. La conformazione del DNA rappresenta un substrato semplice per facilitare l'interazione dei cationi metallici, con la conseguente formazione dei ROS (Trachootham *et al.*, 2009). La struttura omogenea del DNA favorisce l'attacco dei gruppi OH tra lo scheletro zucchero-fosfato

e le basi azotate, con la conseguente rottura di uno o entrambi i filamenti di DNA, eliminazione di basi e formazione di legami fra le due eliche del DNA. Le alterazioni del DNA indotte da agenti chimici e fisici portano alla rottura del doppio o del singolo filamento, modificazioni delle basi azotate, e legami crociati DNA-DNA o DNA-proteine. L'integrità della struttura del DNA, inoltre, può essere alterata tramite la permanenza di alcuni inquinanti che si accumulano nei tessuti provocando genotossicità (Shugart, 1995) e quindi mutagenesi (Siu *et al.*, 2004).

2. SCOPO DELLA TESI

L'inquinamento da farmaci è un problema ambientale emergente. La letteratura scientifica indica che i farmaci possono essere considerati degli inquinanti ubiquitari e pseudo-persistenti, in quanto continuamente riversati in ambiente. Una volta somministrati, molti farmaci non vengono assorbiti completamente dall'organismo e vengono pertanto escreti attraverso le feci o le urine. D'altra parte i sistemi di depurazione delle acque risultano spesso inefficaci nella rimozione di queste molecole, che pertanto arrivano ai fiumi. Molti studi sperimentali, effettuati in fiumi o laghi ed acque marino-costiere, hanno mostrato che i farmaci sono presenti ubiquitariamente in concentrazioni relativamente basse ma comunque preoccupanti. Essi sono infatti sostanze disegnate per suscitare risposte specifiche nell'uomo o negli animali già a basse concentrazioni. Infatti recenti studi di laboratorio hanno dimostrato che miscele di farmaci, con composizione e concentrazione simili a quelle effettivamente riscontrate nell'ambiente anche in Italia, possono avere effetti sugli animali acquatici.

Tra i farmaci riscontrati nei corsi d'acqua e negli ambienti marino-costieri, ve ne sono alcuni che suscitano particolare interesse come ad esempio gli antidepressivi Dropaxin, Prozac e Zoloft, che agiscono favorendo la permanenza del neurotrasmettitore serotonina (5-HT) nella fessura sinaptica. Altri farmaci di interesse sono i bloccanti dei recettori adrenergici di tipo β , somministrati a pazienti con patologie cardiovascolari; fra questi il principio attivo più rappresentativo è il propranololo.

Questi farmaci hanno effetti specifici sull'Uomo, e a livello cellulare interferiscono con lo stesso meccanismo d'azione mediato dal secondo messaggero AMP ciclico, la fluoxetina (principio attivo del Prozac) mantenendo più a lungo l'agonista (5-HT) nella fessura sinaptica, e il propranololo bloccando l'accesso ai recettori (β adrenergici ma in maniera meno efficace anche i serotoninergici di tipo 1). Tali effetti si osservano anche in organismi acquatici non bersaglio, ad es. i mitili (Tesi Tosarelli, dicembre 2011). Tuttavia i farmaci hanno anche effetti non specifici, in genere di tipo ossidativo.

Nell’Uomo questo si manifesta quando i farmaci vengono assunti per tempi lunghi o ad alte dosi.

In questa tesi vogliamo studiare nei mitili, esposti a concentrazioni ambientali di fluoxetina e propranololo, si osserva l’induzione delle difese antiossidanti.

Questo lavoro di tesi, condotto presso i laboratori di fisiologia e biochimica ambientale del CIRSA di Ravenna, quindi, era indirizzato a studiare l’espressione di geni codificanti per gli enzimi superossido dismutasi, catalasi e glutazione s-transferasi nei mitili esposti a diverse concentrazioni dei farmaci, propranololo e fluoxetina. Inoltre si è voluto valutare l’effetto della miscela delle due sostanze, considerando che i farmaci in ambiente sono sempre in combinazione con altri farmaci o altri contaminanti. Superossido dismutasi, catalasi e glutazione s-transferasi, pur con diversi ruoli, sono coinvolti nella risposta allo stress ossidativo, e rappresentano uno dei sistemi di difesa più importanti nel nostro organismo contro gli effetti dei radicali liberi dell’ossigeno (ROS) che si formano nei processi metabolici all’interno dell’organismo stesso, ma possono originare, in quantità spesso rilevanti, per esposizione a xenobiotici. Il mancato funzionamento di questa classe di enzimi antiossidanti può causare diversi danni alla cellula esposta a stress ossidativi, quali danno al DNA, ossidazione delle proteine, perossidazione lipidica e perdita dell’integrità delle membrane cellulari.

3.MATERIALI E METODI

3.1 *Il mitilo Mediterraneo (Mytilus galloprovincialis)*

La specie modello utilizzata in questo lavoro di Tesi è il *Mytilus galloprovincialis*, organismo che permette di valutare i meccanismi d'azione, l'eventuale tossicità e il bioaccumulo dei farmaci fluoxetina e il propranololo. I molluschi bivalvi sono organismi sessili che vivono nell'interfaccia acqua/sedimento filtrando grandi volumi d'acqua contendo materiale sospeso e colloidali (Gagnè *et al.*, 2007). Questi animali vivono in ambienti caratterizzati da un ampio range di salinità e temperatura e sono estremamente tolleranti verso i cambiamenti dei parametri biotici e abiotici, rappresentando quindi un modello adatto allo studio delle alterazioni fisiologiche imposte agli ambienti di transizione. I mitili presentano una struttura estremamente semplice; sono in grado di insediarsi su rocce o strutture sommerse grazie ad un filamento, detto bisso che viene prodotto dalla ghiandola bissogena, presente sulla linea medio-ventrale del piede, o bisso. Ogni filamento termina in una placca dove avviene la fissazione al substrato. Il piede si trova tra i lobi del mantello e si presenta come una formazione impari disposta lateralmente in mezzo alle branchie. Le valve sono ricoperte dal mantello, questo tessuto è formato da due lobi di tessuto ed è responsabile dell'accumulo delle sostanze di riserva e dello sviluppo delle gonadi. La respirazione avviene attraverso le branchie, che sono responsabili sia dello scambio gassoso sia della captazione delle particelle alimentari che penetrano nella cavità del mantello. Nel presente studio, sono stati selezionati i mitili quali bioindicatori ambientali poiché sono particolarmente esposti a contaminanti, ed essendo organismi filtratori, sono adatti a rilevare un'eventuale contaminazione ambientale. Essendo inoltre organismi sessili, permettono la valutazione complessiva del sito in cui vivono, mostrando l'effetto cumulativo di tutti i fattori di stress a cui sono sottoposti. Possono essere utilizzati anche

per studi di laboratorio *in vivo*, in quanto sono facilmente allevabili ed il loro mantenimento è abbastanza semplice (Viarengo e Canesi, 1991).



Fig 3.1 Anatomia del *Mytilus galloprovincialis*.

3.1.1. Il mitilo come organismo sentinella

Alcuni organismi sono adatti meglio di altri per gli studi di ecotossicologia. I molluschi bivalvi sono stati largamente utilizzati come organismi sentinella nei programmi di biomonitoraggio per gli ambienti marino costieri (Viarengo *et al.*, 2007). Queste specie devono poter fornire misure sensibili ed ecologicamente rilevanti della risposta indotta da variazioni ambientali (Bolognesi C, Venier P, 2004), e per far questo devono disporre di alcune caratteristiche di base. Innanzi tutto l'organismo deve essere rappresentativo del ruolo ecologico che svolge all'interno dell'ecosistema oggetto di studio, deve essere di facile reperibilità e preferibilmente sessile o poco mobile. Ma una delle più importanti caratteristiche riguardano l'incapacità dell'organismo di regolare la concentrazione tissutale dello xenobiotico.

Infatti se nell'ecosistema la concentrazione dell'inquinante aumenta, questa deve aumentare anche nei tessuti dell'organismo. Gli organismi sentinella sono quindi *organismi non-regolatori*, a differenza degli organismi regolatori che mantengono costante la concentrazione tissutale degli inquinanti anche se questa varia nell'ambiente in cui essi vivono. Si prestano bene a tale scopo alcuni pesci grassi, come le anguille; molluschi, sessili e filtratori; alcuni crostacei e altri invertebrati. Nel complesso questi organismi consentono di ottenere un'informazione *integrata* dell'ambiente, mentre le semplici analisi di una matrice, per esempio l'acqua, consentono di ottenere informazioni *puntiformi* (analisi che da informazioni al momento del prelievo). *Mytilus galloprovincialis* e altri mitili marini sono ampiamente utilizzati come organismi sentinella nei programmi di monitoraggio ambientale a causa della loro ampia distribuzione, stile di vita sedentario, la tolleranza ad un'ampia gamma di condizioni ambientali, e perché sono filtratori con un metabolismo molto basso, che permette il bioaccumulo di molte sostanze chimiche nei loro tessuti (Viarengo *et al.*, 2007). Recenti studi indicano che le cozze sono organismi idonei a valutare gli effetti contaminanti sui meccanismi fisiologici coinvolti nella segnalazione cellulare e nel controllo della risposta allo stress (Martin-Diaz *et al.*, 2009; Barmo *et al.*, 2011; Franzellitti *et al.*, 2011). La ghiandola digestiva svolge un ruolo centrale nel metabolismo di questi organismi attraverso la digestione delle particelle di cibo e la distribuzione delle sostanze nutrienti alle gonadi (Dimitriadis *et al.*, 2004). Nei bivalvi, la valutazione di una batteria di biomarker diagnostici nella ghiandola digestiva è ampiamente utilizzato al fine di monitorare le risposte precoci ai fattori di stress ambientale (Moore *et al.*, 2006; Dagnino *et al.*, 2007). Tale batteria comprende, ad esempio, la valutazione della stabilità delle membrane lisosomiali, l'accumulo di lipofuscine e di lipidi neutri nei lisosomi, dell'attività della catalasi, il principale enzima coinvolto nella disintossicazione da H₂O₂, e della glutazione S-transferasi (GST), che è responsabile per la detossificazione di diversi composti. Inoltre, a queste analisi può essere affiancata la valutazione dell'espressione di geni coinvolti nella risposta antiossidante, e di quelli codificanti per le metallotioneine (Zorita *et al.*, 2007).

3.2. Esposizione dei mitili ai farmaci fluoxetina e propranololo

Per allestire l'esperimento sono stati selezionati mitili raccolti dal Nord-ovest del Mar Adriatico dai pescatori della Cooperativa Copr.al.mo e trasferiti presso il laboratorio in vasche contenenti acqua di mare ad aereazione continua. Gli animali sono stati acclimatati per tre giorni in vaschette contenenti 60 L di acqua di mare aerata (1 animale per litro acqua di mare) a 16 °C, sottoposti a un fotoperiodo naturale e alimentati una volta al giorno con algal slurry (Koral filtrator, Xaqua, Italy).

I farmaci utilizzati nella presente Tesi sono la fluoxetina (RS)-N-metil-3-fenil-3-[4-(trifluorometil)fenossi]-propan-1-ammina, e il propranololo, 1-naftalen-1-ilossi-3-(propan-2-ilammino)propan-2-olo cloridato (purezza $\geq 98\%$). Entrambe le sostanze sono state acquistate da Sigma Aldrich (Milano, Italia).

Ai fini del presente studio, l'attività sperimentale è stata suddivisa in due fasi:

FASE I) esposizione dei mitili ai singoli farmaci. I mitili sono stati esposti per 7 giorni a cinque diverse concentrazioni di ciascun farmaco, scelte tenendo conto dei dati in letteratura riportanti i livelli misurati in vari sistemi acquatici (Franzellitti et al., 2011). In particolare le concentrazioni selezionate per la fluoxetina (FX) sono 0.3, 3, 30, 300, 3000 ng/L, per il propranololo (PROP) 0.3, 3, 30, 300, 30000 ng/L.

FASE II) esposizione dei mitili alla miscela FX+PROP. Gli organismi sono stati esposti per 7 giorni a quattro condizioni sperimentali differenti: controllo, fluoxetina (FX), propranololo (PROP) e la miscela dei due farmaci (FX+PROP). Le concentrazioni scelte per questi esperimenti sono 0.3 ng/L di FX, 0.3 ng/L di PROP, la somma delle due concentrazioni nella miscela FX+PROP.

Per entrambe le fasi sperimentali, il disegno sperimentale ha previsto l'utilizzo di 3 vasche per ciascuna condizione, ed ogni vasca conteneva 15 mitili in 15 L di acqua di mare (totale=45 mitili per ogni condizione). I mitili sono stati alimentati una volta al giorno contemporaneamente alla somministrazione dei farmaci. A ciascun esperimento è stato associato un gruppo di organismi di controllo (controllo sperimentale), mantenuto nelle stesse condizioni di alimentazione, temperatura e ossigenazione degli organismi sottoposti ai diversi trattamenti.

3.2.1.Fluoxetina

La fluoxetina (FX) è il farmaco più rappresentativo della famiglia degli inibitori del reuptake della serotonina (SSRI). L'effetto degli inibitori del reuptake della serotonina è quello di far permanere più a lungo il neurotrasmettitore serotonina nelle fessure sinapitiche, quindi di aumentarne l'effetto. Questo neurotrasmettitore è coinvolto in molti meccanismi, sia ormonali che neuronali, ed è implicato in molteplici funzioni come ad esempio l'assunzione di cibo ed il comportamento sessuale, oltre che nel tono dell'umore. Gli SSRI sono principalmente indicati per la depressione, ma vengono anche prescritti per i trattamenti compulsivi del comportamento e per i disordini alimentari e di personalità (Brooks *et al.*, 2003). La FX è un farmaco messo in commercio quasi 20 anni fa, ed è il principio attivo del Prozac (Van Harten, 1993).

Una serie di studi recenti hanno documentato una vasta gamma di effetti che la FX può provocare sul comportamento e sulla fisiologia di alcuni organismi acquatici. Nei crostacei, la FX aumenta la dimensione delle ovaie e degli ovociti nel gambero *Procambrus clarkii* (Kulkarni *et al.*, 1992); analogamente, nel granchio violinista, *Uca puilator*, può stimolare sia lo sviluppo ovarico (Kulkarni e Fingerman., 1992) e testicolare (Sarojini *et al.*, 1993), mentre nei gamberetti e nei granchi violinisti promuove la dispersione del pigmento rosso (Hanumante e Fingerman, 1983). Nei bivalvi, gli SSRI inducono un certo numero di processi riproduttivi compresa la emissione di gameti (Fong., 1998; Fong *et al.*, 1998; Honkoop *et al.*, 1999), promuovono il movimento rotazionale delle ciglia negli embrioni dei gasteropodi (Uhler *et al.*, 2000), e inducono la metamorfosi larvale nei gasteropodi (Cooper e Leise., 1996). E' stato stimato che circa l'11% della FX assunta come farmaco viene rilasciata nell'ambiente (Van Harten, 1993), dove è resistente all'idrolisi e fotolisi (Kwon e Armbrust, 2006). Nell'organismo, la FX è metabolizzata dal citocromo P-450 a dare il suo metabolita attivo norfluoxetina (NFX) (Heimke e Hartter, 2000), ed il 7% di questo composto viene escreto invariato attraverso le urine (Van Harten, 1993).

La FX è comunemente rilevata nei sistemi acquatici in concentrazioni che variano tra i 12 e 540 ng/L (Kolpin *et al.*, 2002; Brooks *et al.*, 2003; Metcalfe *et al.*, 2010) e questa sostanza si può accumulare nel cervello, fegato e tessuto muscolare dei pesci (Mennigen *et al.*, 2010). Le più alte concentrazioni di FX e di NFX sono state ritrovate nel cervello,

con valori medi pari a 1,6 ng/g di FX e di 8,9 ng/g di NFX (Brooks *et al.*, 2005). Numerosi dati dimostrano l'impatto dannoso che la FX ha sulla nutrizione (Mennigen *et al.*, 2009), sul comportamento (Semsar *et al.*, 2004) e sulla riproduzione (Mennigen *et al.*, 2008; Lister *et al.*, 2009) nei pesci.

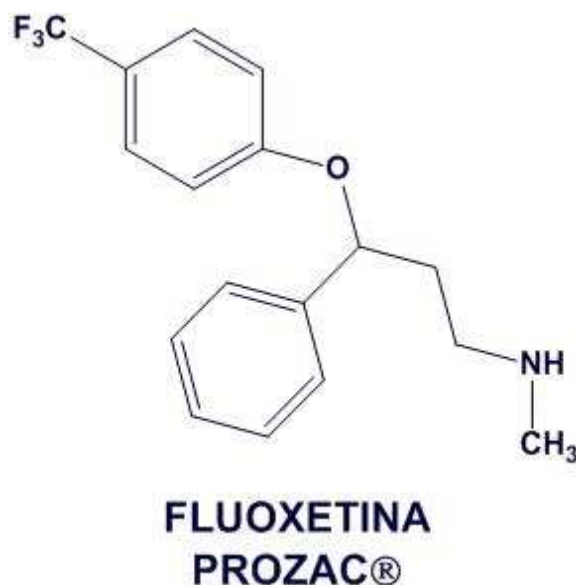


Fig. 3.2.1 Struttura chimica della fluoxetina.

3.2.2. Propranololo

Il Propranololo (PROP) è il farmaco più rappresentativo della famiglia degli antagonisti dei recettori beta adrenergici, ovvero beta-bloccanti. Questi agiscono come inibitori competitivi e sono usati nei trattamenti della ipertensione. Il sistema adrenergico è coinvolto in molte funzioni fisiologiche, come la regolazione dell'apporto di ossigeno al cuore, della frequenza cardiaca, dei meccanismi di vasodilatazione dei vasi sanguigni e della bronco dilatazione. Il sistema adrenergico è inoltre coinvolto nel metabolismo dei carboidrati e dei lipidi (Jacob *et al.*, 1998).

Il PROP raggiunge l'ambiente acquatico attraverso una varietà di percorsi, dopo una rimozione incompleta negli opportuni impianti di trattamento delle acque reflue. In alcuni impianti di depurazione in Germania si è riscontrato che il 96% del propranololo viene rimosso dai depuratori; tuttavia questa sostanza è stata ritrovata ubiquitariamente nei fiumi e torrenti in America e in Europa a concentrazioni dell'ordine dei ng/L, con le concentrazioni massime e medie che raggiungendo 590 e 12 ng/L, rispettivamente (Ashton *et al.*, 2004; Huggett *et al.*, 2003b; Ternes, 1998), negli estuari quella massima è di 56 ng/L (Thomas e Hilton, 2004) e 1900 ng/L negli affluenti delle acque di scarico (Santos *et al.*, 2010).

Rispetto agli altri beta.bloccanti, il PROP è il più lipofilo dato che in acqua di mare la sua Kow è 3.5 (Fent *et al.*, 2006). Questa caratteristica lo rende più affine alle membrane biologiche, e quindi gli conferisce maggiore tendenza al bioaccumulo nei tessuti. Recenti studi hanno dimostrato che il PROP si accumula nei tessuti dei teleostei, e raggiunge concentrazioni ematiche pari a mg/L, superiori a quelle alle quali si ottiene l'effetto terapeutico nell'uomo (Giltrow *et al.*, 2009). Inoltre, il PROP è in grado di raggiungere concentrazioni di 360 mg/g di tessuto (peso fresco) nei mitili (Ericson *et al.*, 2010).

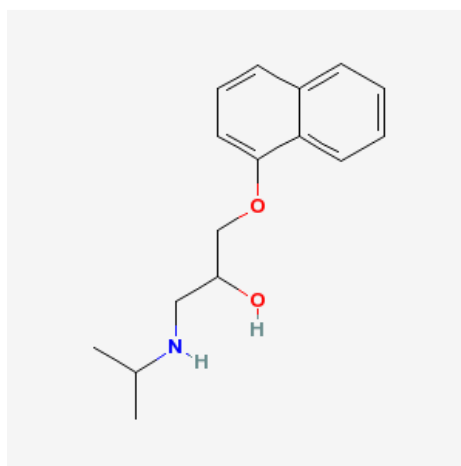


Fig. 3.2.2 Struttura chimica del propranololo.

3.3.Estrazione RNA

Per i campioni di tessuto, l'RNA totale è stato ottenuto da circa 100 mg di ghiandola digestiva o di mantello prelevati da mitili esposti a differenti condizioni sperimentali e da quelli di controllo. Il metodo di estrazione seguito è quello descritto da Chomczynski e Sacchi (1987) e prevede l'utilizzo del reagente il Trizol (Life Technologies).

3.3.1.Retrotrascrizione dell'RNA

La retrotrascrizione è quel processo che permette di convertire l'RNA di partenza in una molecola di DNA a singolo filamento ad esso complementare (cDNA).

Questa reazione è catalizzata dalla trascrittasi inversa (o DNA polimerasi RNA-dipendente), un enzima che si serve del filamento di RNA come stampo, polimerizzando nel filamento di sintesi i deossiribonucleotidi-trifosfato (dNTPs) complementari alla sequenza del filamento stampo. La sintesi del cDNA è resa possibile dall'utilizzo di oligonucleotidi sintetici detti inneschi (o primers) che, appaiandosi alla sequenza di RNA ad essi complementari, costituiscono un piccolo tratto a doppio filamento dal quale la trascrittasi inversa può iniziare la sintesi del filamento stampo. In questo lavoro di Tesi sono stati impiegati dei primers a sequenza arbitraria (*random primers*), che si vanno a legare a diverse regioni delle molecole di RNA, massimizzando quindi la resa delle reazioni. Per ogni campione il cDNA è stato sintetizzato a partire da 1 µg di RNA totale, in presenza di 250 ng di random primers (Sigma Aldrich) e 200 unità dell'enzima RevertAID H minus M-Mulv Reverse Transcriptase (Fermentas). La reazione di retro trascrizione consiste in tre fasi di incubazione:

- Ibridazione dei random primers sui filamenti di RNA (25 °C→10 minuti);
- Retro trascrizione (45°C→60 minuti);
- Inattivazione dell'enzima (70°C→10 minuti).

I campioni di cDNA così ottenuti sono stati conservati a -20 °C e utilizzati nella successiva fase di amplificazione.

3.4. La PCR semi-quantitativa

La reazione a catena della DNA polimerasi (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) consente l'amplificazione di specifici frammenti di acidi nucleici, ossia la produzione *in vitro* di un elevato numero di copie di una specifica sequenza di DNA. Tale metodologia ha rivoluzionato l'attività dei laboratori di ricerca e diagnostica trovando applicazioni ed impieghi in svariati campi della medicina e della biologia. Infatti la PCR è una reazione di amplificazione *in vitro* di uno specifico frammento di DNA per mezzo di una DNA polimerasi, e consente, pertanto, di ottenere rapidamente milioni di molecole identiche di DNA a partire da quantità estremamente ridotte dell'acido nucleico. Un prerequisito indispensabile al realizzarsi della reazione è la conoscenza delle sequenze alle estremità della regione bersaglio. Infatti, nella reazione sono coinvolti due oligonucleotidi a singolo filamento (*primer*) complementari alle regioni fiancheggianti il segmento di DNA che si vuole amplificare. Appaiandosi a queste regioni, i primers costituiscono un piccolo tratto di DNA a doppia catena, dal quale la DNA polimerasi può iniziare la sintesi, ossia la formazione di legami fosfodiesterici tra l'estremità 3' del segmento iniziatore e quella 5' del dNTP complementare allo stampo. La reazione di PCR consiste nella ripetizione di diversi cicli termici (25-35), ognuno dei quali è costituito da tre fasi :

1.denaturazione: separazione dei due filamenti che costituiscono la doppia catena del DNA stampo per riscaldamento a 90-98 °C.

2.appaiamento degli inneschi (annealing): i primers si appaiano alle sequenze complementari sui due filamenti stampo. La temperatura di annealing è un parametro variabile capace di determinare la specificità della reazione, quindi può variare in funzione dei frammenti che devono essere amplificati e dei primers utilizzati, ma in generale è compresa tra i 40 e 60 °C.

3.estensione: la temperatura viene innalzata ad un valore in genere intermedio tra quello di denaturazione e quello di appaiamento (68-72 °C), che risulti ottimale per l'attività della DNA polimerasi; questa catalizza l'estensione dei filamenti di nuova sintesi a partire dall'estremità ossidrilica 3'.

In questa Tesi la valutazione dei profili di espressione dei geni di mitilo codificanti per la catalasi (*cat*), glutatione-s-transferasi (*GST*), e superossido-dismutasi (*SOD*) è stata condotta mettendo a punto un protocollo di PCR semi-quantitativa. Questa metodica consiste in un protocollo di PCR ottimizzato per permettere la quantificazione del prodotto della reazione durante la fase lineare di aumento della reazione, cioè quando si può stabilire una relazione lineare tra la quantità di prodotto di PCR e la quantità iniziale dell'RNA corrispondente al gene bersaglio contenuto nel template, consentendo, pertanto, di stimare indirettamente l'espressione del gene nel campione in esame. Per gli scopi di questa Tesi è stato impiegato un protocollo di quantificazione relativo, che prevede l'analisi di un controllo endogeno utilizzato per la normalizzazione e la quantificazione relativa del gene bersaglio. Il controllo endogeno impiegato è il 18S rRNA (Dondero *et al.*, 2005).

Per l'amplificazione dei geni bersaglio, sono state impiegate delle coppie specifiche per le sequenze geniche di CAT, GST, e SOD di *M.galloprovincialis*, sviluppate e utilizzate in precedenza in esperimenti di PCR *real time*. Le sequenze dei primer specifici per CAT e GST, e per il controllo endogeno 18s rRNA sono riportate da Barmo *et al.* (2011) e da Dondero *et al.*, (2005), rispettivamente. La coppia di primer specifici per il gene SOD di mitilo è stata costruita sulla base di una sequenza di *Mytilus galloprovincialis* (Numero di accesso in GenBank: FM177867) e utilizzando software specifici per la costruzione di primers utilizzabili in protocolli di espressione genica.

La miscela di retro trascrizione è stata diluita 1:10 con acqua mQ sterile, le condizioni di amplificazione sono state ottimizzate in una serie di esperimenti preliminari. Per ogni gene target, la PCR è stata condotta in un volume finale di 20 µL contenente:

Buffer 10X (Life technologies)	1X
MgCl ₂	1.5 mM
dNTPs (miscela equimolare)	0.2 Mm
primers	0.2 µM ciascuno
AccuPrime Taq DNA polimerasi (Life Technologies)	0.4 µL
cDNA	1µL

I primers per l'amplificazione del controllo endogeno 18s rRNA sono stati aggiunti al ciclo termico opportuno per poter raggiungere i 20 cicli di amplificazione. Il ciclo termico utilizzato è stato ottimizzato per ciascun gruppo di primer, in particolare per quanto riguarda il numero di cicli di PCR; le condizioni finali sono quindi riportate qui di seguito: denaturazione iniziale (4 minuti a 96°C), seguita da 28 cicli composti da una fase di denaturazione (45 sec a 95°C), annealing (30 sec a 58°C), estensione (45 sec a 68°C). I prodotti di PCR sono stati divisi in due aliquote da 10 µl ciascuna, alle quali è stato aggiunto un tampone di caricamento 6X (0.25% blu di bromo fenolo peso/volume, 30% glicerolo in soluzione acquosa volume/volume), e sono stati separati mediante elettroforesi orizzontale su gel al 2.5% di agarosio wide range (Sigma) in tampone TBE (45 mM Tris-Borato, 1 mM EDTA). La rilevazione delle bande elettroforetiche è stata ottenuta aggiungendo al gel in fase di polimerizzazione una soluzione di Syber Safe (10000X, Biotium), un agente intercalante che si lega ai frammenti di DNA a doppio filamento e ne permette la rilevazione mediante esposizione ad una sorgente di raggi UV.

L'acquisizione delle immagini relative alle corse elettroforetiche è stata ottenuta attraverso il sistema Image Master VDS (Amersham Pharmacia Biotech).

La quantificazione dei livelli di espressione genica è stata ottenuta analizzando le immagini con il programma ImageMaster Total Lab ver 1.0 (Amersham Pharmacia Biotech), che misura la densità ottica delle bande elettroforetiche. I dati ottenuti per i geni HSP70 sono stati quindi normalizzati su quelli rilevati per il controllo positivo 18s rRNA e espressi come rapporti d'induzione rispetto al controllo sperimentale.

La significatività dei risultati è stata valutata mediante ANOVA a 1 via attraverso il programma Sigma Stat (SPSS); le differenze di ciascun campione rispetto al controllo sperimentale sono state valutate mediante il Bonferroni t-test. Le differenze sono considerate statisticamente significative per $p < 0.05$.

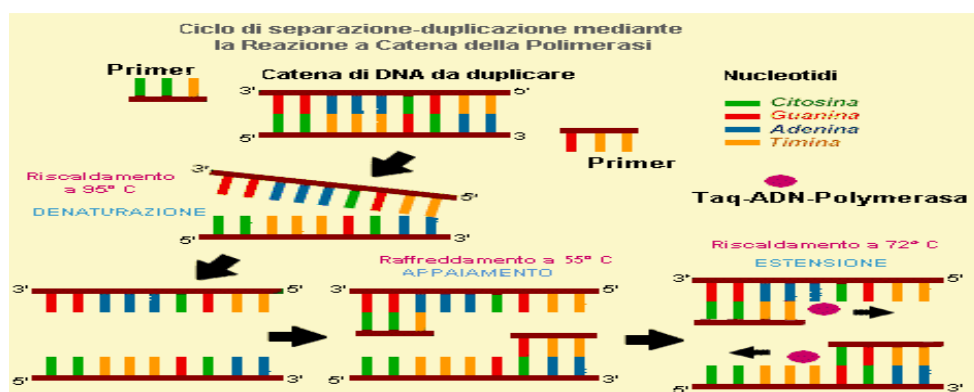


Fig.3.4 Schema raffigurante un ciclo di Reazione a catena della Polimerasi(PCR).

4. RISULTATI

4.1. Effetto dell'esposizione *in vivo* dei mitili ai farmaci fluoxetina e propranololo

Riportiamo i risultati relativi all'espressione dei geni codificanti per gli enzimi catalasi, superossido dismutasi e glutathione s-transferasi nella ghiandola digestiva dei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) esposti per 1 settimana a concentrazioni crescenti di fluoxetina (FX) e di propranololo (PROP).

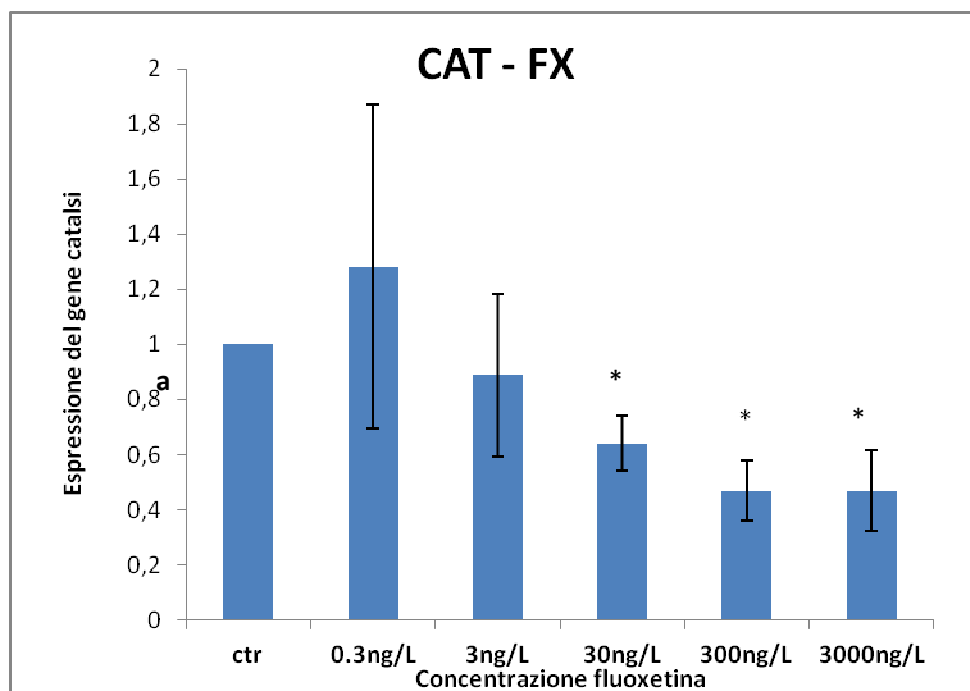


Fig.4.1.Variazione dei livelli dell'espressione del gene codificante per la catalasi (*cat*) nella ghiandola digestiva dei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) esposti a concentrazioni crescenti di fluoxetina (FX). I mitili sono stati esposti per 1 settimana a 5 concentrazioni di FX; in parallelo, un gruppo di organismi di controllo (ctr) è stato mantenuto nelle stesse condizioni sperimentali degli organismi esposti ai diversi trattamenti. L'espressione genica è stata valutata tramite PCR semiquantitativa come riportato nel materiale e metodi. I livelli di espressione per il gene *catalasi* sono stati normalizzati su quelli del 18S rRNA, che è stato utilizzato come controllo endogeno. I dati sono espressi come media \pm ES (n=3) dell'espressione relativa rispetto al

controllo. Gli asterischi indicano delle differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Nella fig.4.1 è possibile notare come l'esposizione dei campioni alla FX induce nella ghiandola digestiva una progressiva sotto-espressione della *catalasi*, che risulta significativa per concentrazioni superiori a 30 ng/L.

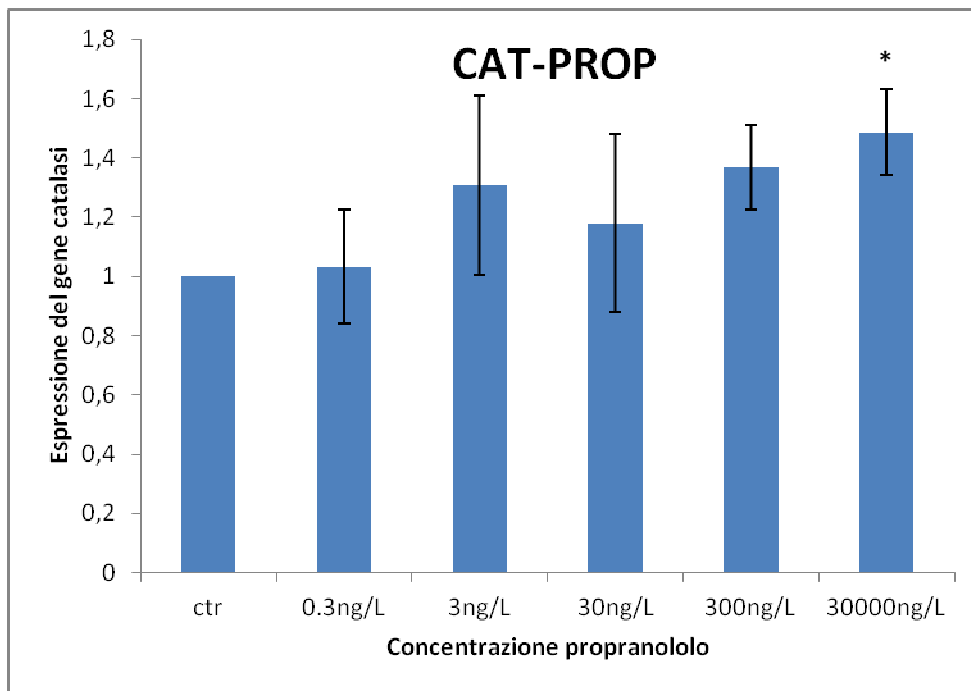


Fig 4.2. Variazione dei livelli dell'espressione del gene codificante per la catalasi (*cat*) nella ghiandola digestiva dei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) esposti a concentrazioni crescenti di propranololo (PROP). I mitili sono stati esposti per 1 settimana a 5 concentrazioni di PROP; in parallelo, un gruppo di organismi di controllo (ctr) è stato mantenuto nelle stesse condizioni sperimentali degli organismi esposti ai diversi trattamenti. L'espressione genica è stata valutata tramite PCR semiquantitativa come riportato nel materiale e metodi. I livelli di espressione per il gene *catalasi* sono stati normalizzati su quelli del 18S rRNA, che è stato utilizzato come controllo endogeno. I dati sono espressi come media \pm ES (n=3) dell'espressione relativa rispetto al controllo. Gli asterischi indicano delle differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

In fig 4.2, nei mitili esposti a concentrazioni crescenti di PROP, il gene *catalasi* risulta progressivamente sovra-espresso rispetto al controllo, raggiungendo variazioni significative nei campioni esposti a 30000 ng/L del farmaco.

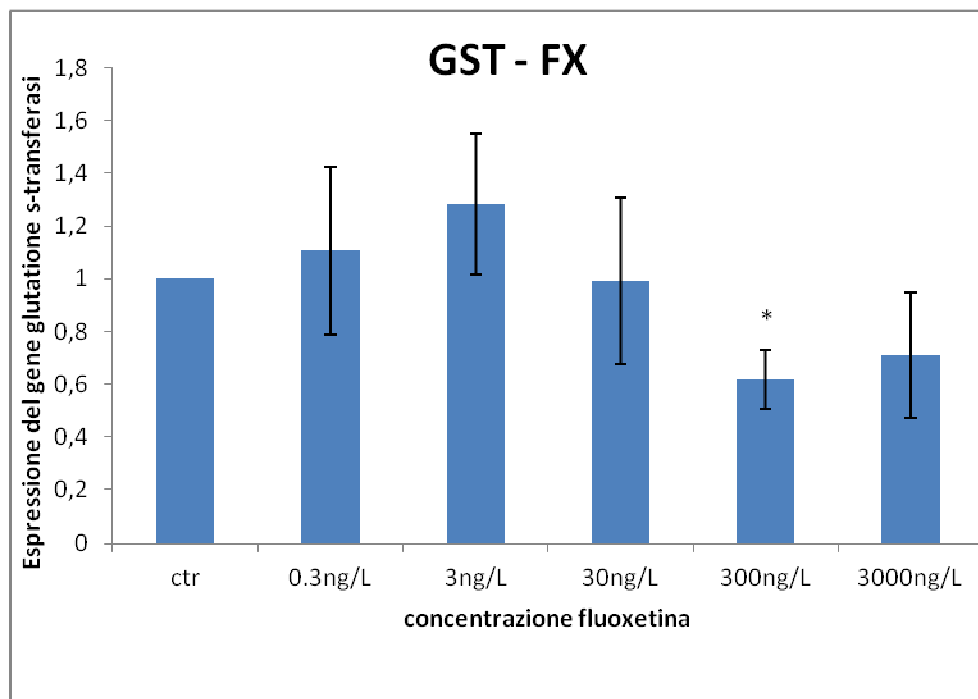


Fig. 4.3 Variazione dei livelli dell'espressione del gene codificante per la glutazione S-transferasi (*GST*) nella ghiandola digestiva dei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) esposti a concentrazioni crescenti di fluoxetina (FX). I mitili sono stati esposti per 1 settimana a 5 concentrazioni di FX; in parallelo, un gruppo di organismi di controllo (ctr) è stato mantenuto nelle stesse condizioni sperimentali degli organismi esposti ai diversi trattamenti. L'espressione genica è stata valutata tramite PCR semiquantitativa come riportato nei materiale e metodi. I livelli di espressione per il gene *glutazione S-transferasi* sono stati normalizzati su quelli del 18S rRNA, che è stato utilizzato come controllo endogeno. I dati sono espressi come media \pm ES (n=3) dell'espressione relativa rispetto al controllo. Gli asterischi indicano delle differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Notiamo in Fig 4.3 come nella ghiandola digestiva ci sia un'inibizione significativa dell'espressione del gene *glutazione s-transferasi* a concentrazioni maggiori di fluoxetina (300ng/L), rispetto alle altre concentrazioni decisamente più basse

4.1.1. Espressione del gene glutathione s-transferasi a cinque concentrazioni di propranololo.

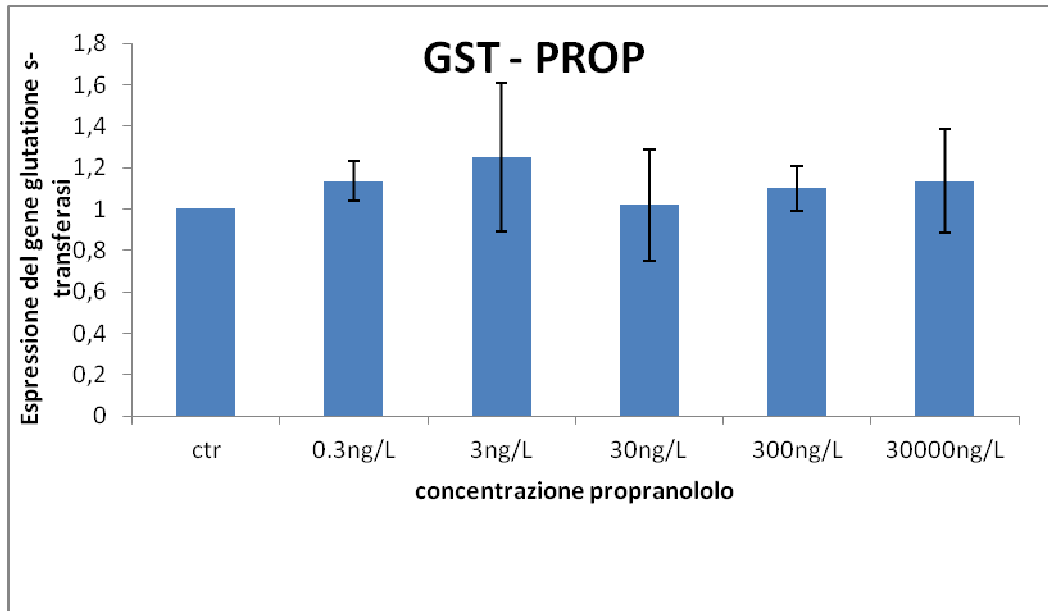


Fig 4.4 Variazione dei livelli dell'espressione del gene codificante per la glutathione S-transferasi (GST) nella ghiandola digestiva dei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) esposti a concentrazioni crescenti di propranololo (PROP). I mitili sono stati esposti per 1 settimana a 5 concentrazioni di PROP; in parallelo, un gruppo di organismi di controllo (ctr) è stato mantenuto nelle stesse condizioni sperimentali degli organismi esposti ai diversi trattamenti. L'espressione genica è stata valutata tramite PCR semiquantitativa come riportato nei materiale e metodi. I livelli di espressione per il gene *glutathione S-transferasi* sono stati normalizzati su quelli del 18S rRNA, che è stato utilizzato come controllo endogeno. I dati sono espressi come media \pm ES (n=3) dell'espressione relativa rispetto al controllo. Gli asterischi indicano delle differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

In Fig.4.4 si può notare come l'espressione del gene *glutathione S-transferasi* nei mitili esposti a concentrazioni crescenti di propranololo (PROP) non mostri delle differenze significative rispetto al controllo.

4.1.2. Espressione del gene superossido dismutasi a cinque concentrazioni di fluoxetina.

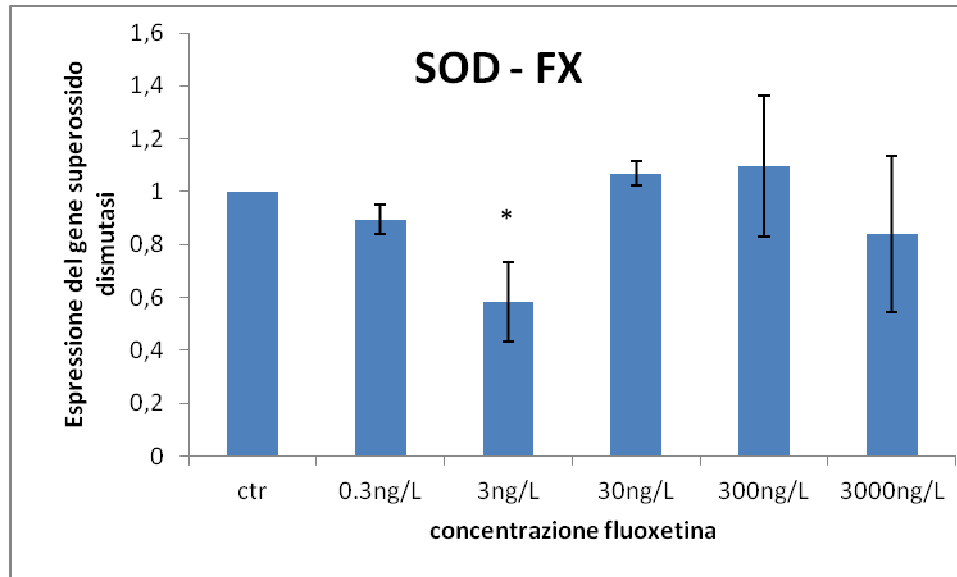


Fig. 4.5 Variazione dei livelli dell'espressione del gene codificante per la superossido dismutasi (SOD) nella ghiandola digestiva dei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) esposti a concentrazioni crescenti di fluoxetina (FX). I mitili sono stati esposti per 1 settimana a 5 concentrazioni di FX; in parallelo, un gruppo di organismi di controllo (ctr) è stato mantenuto nelle stesse condizioni sperimentali degli organismi esposti ai diversi trattamenti. L'espressione genica è stata valutata tramite PCR semiquantitativa come riportato nei materiale e metodi. I livelli di espressione per il gene *superossido dismutasi* sono stati normalizzati su quelli del 18S rRNA, che è stato utilizzato come controllo endogeno. I dati sono espressi come media \pm ES (n=3) dell'espressione relativa rispetto al controllo. Gli asterischi indicano delle differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Nella Fig. 4.5 si nota come nella ghiandola digestiva il gene *superossido dismutasi* è significativamente sotto-espresso rispetto ai valori di controllo nei mitili esposti a concentrazioni 3 ng/L di fluoxetina(FX).

4.1.3. Espressione del gene superossido dismutasi a cinque concentrazioni di propranololo differenti.

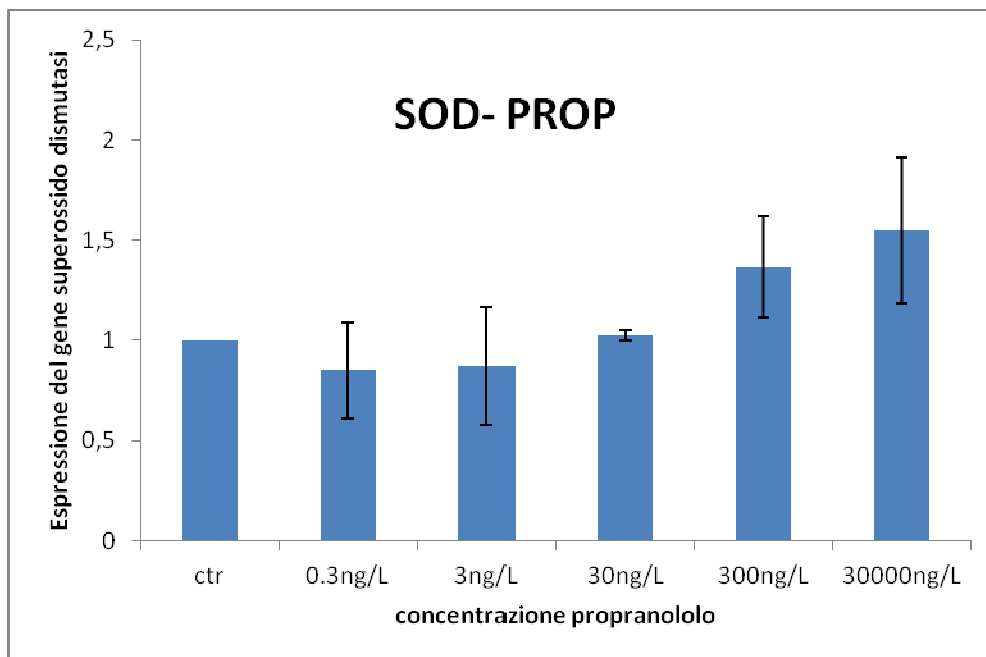


Fig 4.6 Variazione dei livelli dell'espressione del gene codificante per la superossido dismutasi (*SOD*) nella ghiandola digestiva dei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) esposti a concentrazioni crescenti di propranololo (PROP). I mitili sono stati esposti per 1 settimana a 5 concentrazioni di PROP; in parallelo, un gruppo di organismi di controllo (ctr) è stato mantenuto nelle stesse condizioni sperimentali degli organismi esposti ai diversi trattamenti. L'espressione genica è stata valutata tramite PCR semiquantitativa come riportato nei materiale e metodi. I livelli di espressione per il gene *superossido dismutasi* sono stati normalizzati su quelli del 18S rRNA, che è stato utilizzato come controllo endogeno. I dati sono espressi come media \pm ES (n=3) dell'espressione relativa rispetto al controllo. Gli asterischi indicano delle differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Nella Fig. 4.6 è possibile vedere come nella ghiandola digestiva dei mitili esposti alle concentrazioni più elevate di propranololo 30000 ng/L (PROP), c'è una sovra espressione del gene *superossido dismutasi*, anche se non significativa; mentre nei campioni esposti a concentrazioni relativamente più basse del farmaco non si è osservata nessuna variazione significativa rispetto al controllo.

4.2. Effetto dell'esposizione in vivo dei mitili alla miscela di fluoxetina e propranololo (FX+PROP)

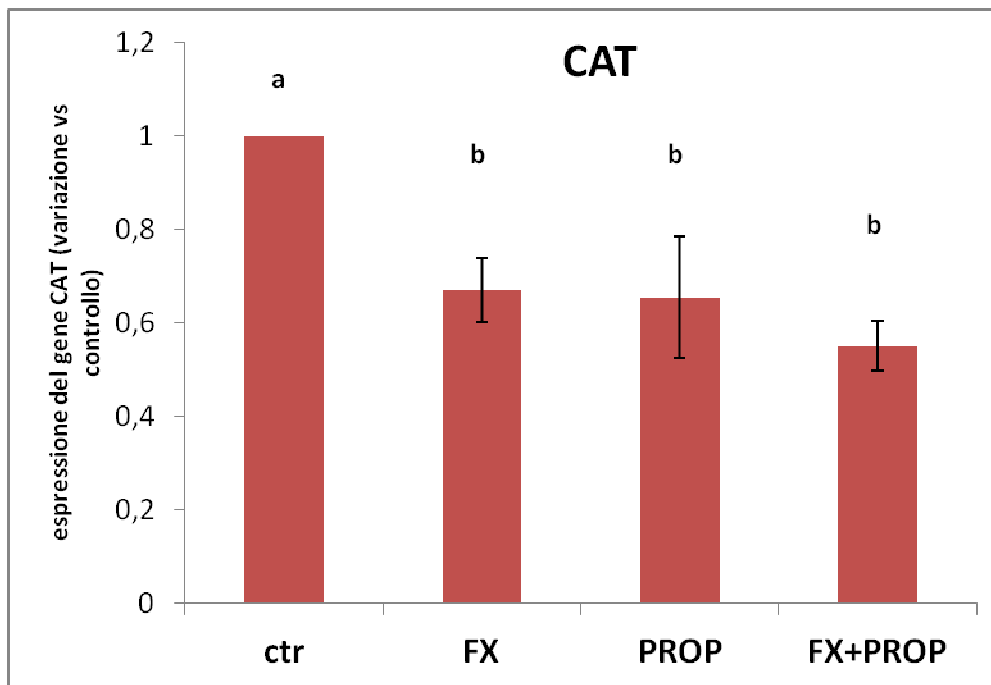


Fig 4.7. Variazioni dei livelli di espressione del gene catalasi nella ghiandola digestiva dei mitili esposti a fluoxetina (FX), 0,3 ng/L, propranololo (PROP), 0,3 ng/L e alla miscela dei due farmaci (FX + PROP), 0,3 ng/L+0,3 ng/L. In parallelo, un gruppo di organismi di controllo (ctr) è stato mantenuto nelle stesse condizioni sperimentali degli organismi esposti ai diversi trattamenti. L'espressione genica è stata valutata mediante PCR semiquantitativa come riportato nei materiale e metodi. I dati sono stati espressi come la media \pm ES dei rapporti di induzione rispetto al controllo (N=6). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Nella ghiandola digestiva il gene *catalasi* è significativamente sotto-espresso rispetto ai valori di controllo nei mitili esposti alla miscela FX+PROP, mentre non ci sono variazioni significative negli organismi esposti alla FX o al PROP (Fig. 4.7).

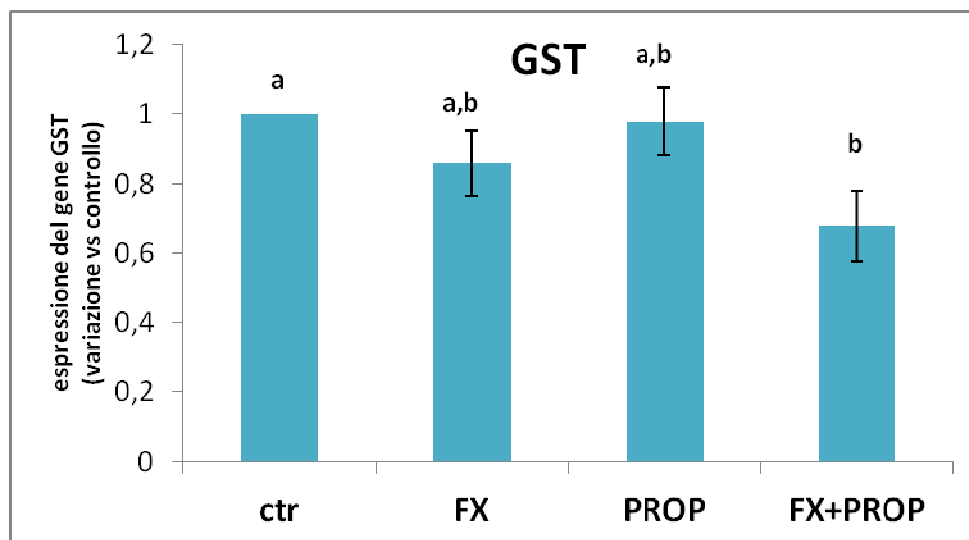


Fig 4.8. Variazioni dei livelli di espressione del gene glutatione s-transferasi nella ghiandola digestiva dei mitili esposti a fluoxetina (FX), 0,3 ng/L, propranololo (PROP), 0,3 ng/L e alla miscela dei due farmaci (FX + PROP), 0,3ng/L+0,3 ng/L. In parallelo, un gruppo di organismi di controllo (ctr) è stato mantenuto nelle stesse condizioni sperimentali degli organismi esposti ai diversi trattamenti. L'espressione genica è stata valutata mediante PCR semiquantitativa come riportato nel materiale e metodi. I dati sono stati espressi come la media \pm ES dei rapporti di induzione rispetto al controllo (N=6). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Nella ghiandola digestiva il gene *glutathione S-transferasi* è significativamente sotto-espresso rispetto ai valori di controllo nei mitili esposti alla miscela FX+PROP, mentre non ci sono variazioni significative negli organismi esposti alla FX o al PROP (Fig. 4.8).

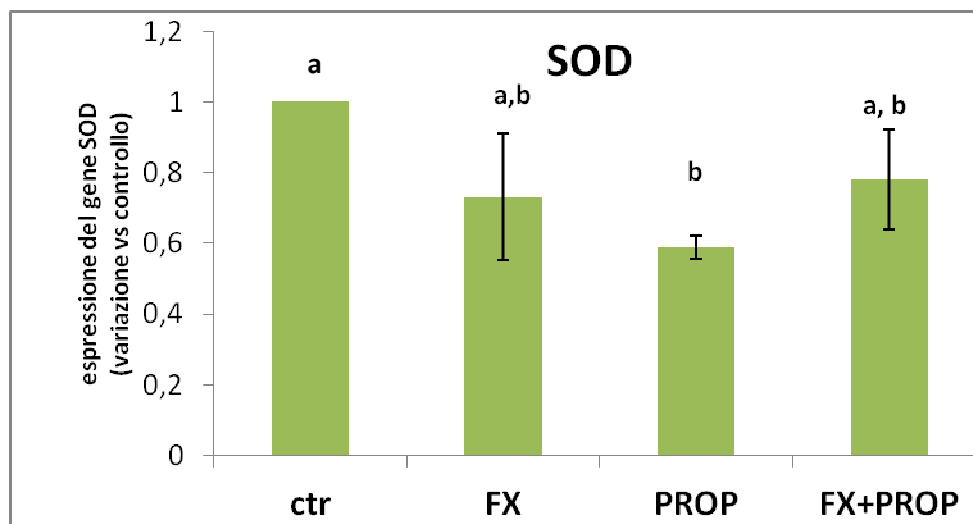


Fig 4.9. Variazioni dei livelli di espressione del gene superossido dismutasi nella ghiandola digestiva dei mitili esposti a fluoxetina (FX), 0,3 ng/L, propranololo (PROP), 0,3 ng/L e alla miscela dei due farmaci (FX + PROP), 0,3 ng/L + 0,3 ng/L. In parallelo, un gruppo di organismi di controllo (ctr) è stato mantenuto nelle stesse condizioni sperimentali degli organismi esposti ai diversi trattamenti. L'espressione genica è stata valutata mediante PCR semiquantitativa come riportato nel materiale e metodi. I dati sono stati espressi come la media \pm ES dei rapporti di induzione rispetto al controllo (N=6). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Nella ghiandola digestiva il gene *superossido dismutasi* è significativamente sotto-espresso rispetto ai valori di controllo nei mitili esposti a FX, PROP e alla miscela dei due farmaci (FX+PROP) (Fig. 4.9).

5. DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

I residui dei farmaci, sia ad uso umano che veterinario, sono presenti in ambiente in concentrazioni che vanno da ng a µg/L, risultando contaminanti emergenti largamente diffusi negli ecosistemi acquatici e terrestri (Santos *et al.*, 2010). Poiché continuamente introdotti e non efficacemente rimossi, i farmaci e i loro derivati sono da considerarsi pseudo-persistenti, e generano preoccupazione per la salute degli animali acquatici e un rischio teorico per chi si alimenta di tali organismi.

Studi ecotossicologici rivelano che gli effetti acuti su crostacei, alghe e larve di pesci sono provocati da concentrazioni di farmaci dell'ordine dei mg/L, mentre quelle misurate nelle acque è mediamente cento-mille volte inferiore (Fent *et al.*, 2006). Tuttavia, dati recenti mostrano che i farmaci si possono bioaccumulare ed avere effetti a lungo termine. Soprattutto occorre tener presente che i farmaci sono sintetizzati per produrre effetti biologici intensi ed avere come effetto collaterale una bassa tossicità acuta. Pertanto, non è da escludere che effetti nocivi in specie non-bersaglio possano essere indotti anche a basse concentrazioni a fronte di un'esposizione ai farmaci a lungo termine e continua, se tali specie sono dotate di opportuni recettori conservati durante l'evoluzione. Tuttavia, potrebbero avere effetti inattesi se i bersagli molecolari sono conservati ma hanno una differente funzione. Inoltre, i farmaci manifestano effetti collaterali se usati a dosi elevate o per lungo tempo. È possibile che tali effetti siano indotti dai farmaci ambientali negli organismi non bersaglio, magari a basse dosi se questi animali sono più sensibili dell'uomo o degli animali di allevamento.

Studi precedenti hanno dimostrato che diversi residui farmaceutici somministrati a concentrazioni compatibili con quelle ambientali sono in gradi di alterare le risposte antiossidanti nei mitili (Martin-Diaz *et al.*, 2009; Gonzalez-Rey e Bebianno, 2011);

infatti, l'induzione dello stress ossidativo sembra essere uno fra gli effetti di tossicità comuni alla maggior parte dei farmaci studiati finora.

Diverse risposte adattative, come ad esempio l'induzione di sistemi enzimatici di citoprotezione, possono essere attivate in risposta ad un stress ossidativo. Queste risposte sono anche largamente utilizzate come *biomarkers* di esposizione ad agenti ossidanti, evidenziando fenomeni di tossicità in ambienti contaminati (Viarengo *et al.*, 2007).

In questo lavoro di tesi è stato messo a punto un protocollo di PCR semi-quantitativa, per la valutazione dell'espressione dei geni codificanti per 3 enzimi-antiossidanti, catalasi (CAT), glutatione S-transferasi (GST) e superossido dismutasi (SOD), al fine di ottenere uno strumento di indagine più sensibile e più informativo dei processi di tossicità potenzialmente indotti dai farmaci (Franzellitti *et al.*, 2010).

Tale approccio è stato impiegato per valutare la risposta anti-ossidante in mitili esposti *in vivo* a fluoxetina (FX), propranololo (PROP), e la miscela dei due farmaci (FX+ PROP). I profili di espressione genica sono stati valutati nella ghiandola digestiva, sito principale di bioaccumulo e del metabolismo degli xenobiotici.

In una prima serie di esperimenti sono stati valutati gli effetti a concentrazioni crescenti dei singoli farmaci (0.3 – 3000 ng/L per FX, 0.3 - 30000 ng/L per PROP). I risultati hanno dimostrato che FX causa una generale diminuzione dell'espressione dei geni CAT. Per quanto riguarda i geni codificanti per GST e SOD si osservano variazioni significative soltanto ad una concentrazione di FX, 300 e 3 ng/L rispettivamente, rispetto ai livelli espressi nel controllo. Per comprendere questi risultati, bisogna tenere presente il ruolo dei tre enzimi nella risposta anti-ossidante. Infatti, la superossido dismutasi (SOD) converte l'anione superossido ($\text{OH}\cdot^-$) in H_2O_2 che è successivamente convertito in acqua e ossigeno dalla catalasi (CAT) (Regoli, 1998). La glutatione-s-transferasi (GST), invece, è un enzima coinvolto nella fase II nel metabolismo degli xenobiotici catalizzando la coniugazione dei prodotti della fase I con il glutatione. Pertanto, la riduzione dei livelli di espressione di CAT non sempre accompagnata dalla significativa variazione dei livelli di espressione di SOD e GST, può indicare che il

sistema anti-ossidante non è in grado di adattarsi in modo efficiente all'alterazione indotta dall'esposizione a FX, portando ad un progressivo aumento dei livelli di stress. A supporto di questa ipotesi, analisi condotte nel nostro laboratorio sugli stessi mitili hanno dimostrato che FX induce un progressivo aumento dei livelli destabilizzazione delle membrane lisosomiali, indice del progressivo aumento dei livelli di stress fisiologico degli organismi. Questo dato, inoltre, ben si correla con la significativa riduzione dei livelli di espressione di CAT, GST e SOD osservate.

Occorre ricordare che la risposta enzimatica alla tossicità chimica mostra tipicamente un andamento “a campana” con un incremento iniziale dovuta alla sintesi degli enzimi, seguita da una diminuzione dell'attività enzimatica dovuto ad un maggiore tasso catabolico e/o dalla diretta inibizione dell'attività delle molecole enzimatiche, da parte dei componenti tossici (Viarengo *et al.*, 2007). Si può pertanto ipotizzare che alle concentrazioni di esposizione più elevate i livelli di stress siano troppo alti per permettere il mantenimento di livelli di sintesi proteica adeguati alle mutate condizioni fisiologiche. Inoltre, studi *in vivo* sul pesce rosso *Carassius auratus* hanno mostrato che FX può indurre una significativa riduzione del tasso metabolico a concentrazioni di esposizione di 540 ng/L e 54 µg/L (Mennigen *et al.*, 2010), riducendo la disponibilità di risorse energetiche per far fronte alla situazione di stress.

Per quanto riguarda gli effetti del PROP, i risultati ottenuti mostrano che nei mitili esposti a concentrazioni crescenti del farmaco i geni CAT e SOD risultano progressivamente sovra-espressi rispetto al controllo, anche se in maniera non significativa mentre i livelli di espressione di GST non sono significativamente alterati. Questi dati sono in apparente disaccordo con quelli riportati da Franzellitti *et al.* (2011), in cui nei mitili esposti a PROP nelle stesse condizioni sperimentali utilizzate nella presente Tesi l'attività dell'enzima CAT aumenta significativamente tra 0.3 e 30 ng/L e diminuisce a concentrazioni più elevate, mentre l'attività di GST aumenta progressivamente con l'aumentare della concentrazione di esposizione. Questo apparente disaccordo può essere legato ai molteplici meccanismi di controllo che regolano la sintesi proteica, a tutti gli stadi di regolazione (trascrizione genica,

maturazione degli mRNA, traduzione), che possono, peraltro, avere diversi tempi di risposta (Khodursky *et al.*, 2003).

Nella seconda fase sperimentale, sono stati valutati gli effetti della miscela dei due composti, le cui concentrazioni nella miscela rappresentano i livelli ambientali. I dati ottenuti indicano FX e PROP possono avere effetti interattivi sulla regolazione dei tre geni coinvolti nella risposta antiossidante, analogamente a quanto rilevato in precedenza in precedenti lavoro di Tesi (Tosarelli, Tesi Magistrale in Biologia Marina, A.A. 2011; Inzolia, Tesi Magistrale in Biologia Marina, A.A. 2011), in cui tali effetti sono stati dimostrati su parametri correlati con il meccanismo di azione terapeutica dei due farmaci. In presenza della miscela si osserva una riduzione significativa dell'espressione del gene CAT, del gene GST mentre non ci sono effetti sul gene SOD.

In conclusione, concentrazioni di propranololo e fluoxetina nell'intervallo di quelle misurate in ambiente possono generare significativi effetti sui geni CAT, GST, e SOD, principali mediatori della risposta allo stress ossidativo. Come riscontrato in precedente letteratura (per review vedi Viarengo *et al.*, 2007), l'attività o l'espressione degli enzimi antiossidanti risente molto dello stato fisiologico dei mitili, e della stagionalità, quindi il ruolo degli enzimi antiossidanti come biomarker deve essere interpretato all'interno di batterie più ampie di risposte subletali degli organismi sentinella. Questi risultati, ottenuti a concentrazioni circa 1.000 volte inferiori rispetto a quelle efficaci nei test ecotossicologici acuti, dimostrano comunque che i farmaci possono avere effetti sugli organismi anche a concentrazioni molto basse come quelle ambientali. In particolare, poiché gli effetti ossidativi sono i più comuni effetti collaterali dei farmaci nell'Uomo che ne assuma elevate quantità o somministrazioni prolungate nel tempo, possiamo affermare che questi effetti hanno luogo anche negli organismi non-target, a concentrazioni basse e dopo soli 7 giorni di esposizione. I dati della tesi non dimostrano che propranololo e fluoxetina hanno effetti deleteri sulle popolazioni o le comunità dei molluschi, ma debbono essere considerati come indicatori della vulnerabilità degli animali a questi composti.

Dal punto di vista ambientale questo approccio, basato sullo studio di *endpoint* molecolari correlati con i meccanismi di risposta allo stress, fornisce informazioni predittive circa i processi che portano ai fenomeni di tossicità e permette di classificare sia il propranololo che la fluoxetina come farmaci che meritano un'attenzione particolare in relazione ai possibili effetti deleteri sugli organismi marini

6.BIBLIOGRAFIA

- Abreu, I.A., Cabelli, D.E., 2010. Superoxide dismutases e a review of the metalassociated mechanistic variations. *Biochim Biophys Acta* 2010. 1804, 263-274.
- Afonso, V., Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A., 2007. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine* 74, 324-329.
- Aherne, G.W., A. Hardcastle, A.H. Nield, 1990. Cytotoxic drugs and the aquatic environment: estimation of bleomycin in river and water samples, *J. Pharm. Pharmacol.* 42, 741–742.
- Aherne, G.W., J. English, V. Marks, 1985. The role of imunoassay in the analysis of microcontaminants in water samples, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 9, 79–83.
- Andersson, J., Woldegiorgis, A., Remberger, M., Kaj, L., Ekheden, Y., Dusan. B., Svenson, A., Brorstrom-Lunden, E., Dye, C., Schlaback, M., 2006. IVL report B1698 Sub report 1: Antibiotics, Anti-inflammatory Substances, and Hormones. 456, 232-245.
- Arthur, J.R., 2000. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* 57, 145-160.
- Ashton, D., Hilton, M., Thomas, K.V., 2004. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Sci. Total Environ.* 333, 167–184.
- Barnes, K., D.W. Kolpin, E.T. Furlong, S.D. Zaugg, M.T. Meyer, L.B. Barber, 2008. A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States—I) Groundwater, *Sci. Total Environ.* 402, 192–200.

- Batt, A.L., D.D. Snow, D.S. Aga, 2006. Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington County, Idaho, USA, *Chemosphere*. 64, 1963–1971.
- Bayne, B.L., Clarke KR, Gray JS ,1988. Background and rationale to a practical workshop on biological effects of pollutants. *Mar Ecol Prog Ser*. 46, 1–5
- Bendz, D., N.A. Paxeus, T.R. Ginn, F.J. Loge, 2005. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden, *J. Hazard. Mater.* 122, 195–204.
- Benotti, M.J., R.A. Trenholm, B.J. Vanderford, J.C. Holady, B.D. Stanford, S.A. Snyder, 2009. Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water, *Environ. Sci. Technol.* 43, 597–603.
- Bernhardt, R., 2004a. Cytochrome P-450. *Encyclopedia Biol. Chem.* 1, 544–549.
- Bernhardt, R., 2004b. Optimized chimeragenesis; creating diverse p450 functions. *Chem. Biol.* 11, 287–288.
- Bolognesi, C., Venier P., 2004. Cap. 13, in: *Mutagenesi Ambientale*. 34, 56-70.
- Borkovic, S.S., Saponjic JS, Pavlovic SZ, Blagojevic DP, Milosevic SM, Kovacevic TB, 2005. The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 141, 366-374.
- Bound, J.P., N. Voulvoulis, 2005. Household disposal of pharmaceuticals as a pathway for aquatic contamination in the United Kingdom, *Environ. Health Perspect.* 113, 1705–1711.
- Bound, J.P., Voulvoulis, N., 2006. Predicted and measured concentrations for selected pharmaceuticals in UK rivers: implications for risk assessment. *Water Res.* 40 (15), 2885–2892.
- Box, A., Sureda A, Deudero S., 2009. Antioxidant response of the bivalve *Pinna nobilis* colonised by invasive red macroalgae *Lophocladia lallemandii*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 149, 456-460.

- Braund, R., B.M. Peake, L. Schieffebien, 2009. Disposal practises for unused medications in New Zeland, *Environ. Int.* 35, 952–955.
- Breton, R., Boxall, A., 2003. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: regulatory drivers and research needs. *QSAR Comb. Sci.* 22, 399–409.
- Brooks, B.W., Chambliss, C.K., Stanley, J.K., Ramirez, A., Banks, K.E., Johnson, R.D., Lewis, R.J., 2005. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 464–469.
- Brooks, B.W., Foran, C.M., Richards, S.M., Weston, J., Turner, P.K., Stanley, J.K., Solomon, K.R., Slattery, M., La Point, T.W., 2003. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicol. Lett.* 142, 169–183.
- Bryant, D.D, Wilson G.N., 1995. Differential evolution and expression of murine peroxisomal membrane protein genes. *Biochemical and Molecular Medicine.* 55, 22-30.
- Calamari, D., E. Zuccato, S. Castiglioni, R. Bagnati, R. Fanelli, 2003. Strategic survey of therapeutic drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy, *Environ. Sci. Technol.* 37, 1241–1248.
- Ceccherelli, V.U., Rossi R., 1984. Population dynamics of *Mytilus galloprovincialis* Lamk. on natural bed in a brackish water environment (Sacca di Scardovari, Po River Delta). *Atti del IV Simposio di Dinamica di Popolazione*, 56, 79-87
- Cerutti, P.A., 1985. Prooxidant states and tumor promotion. *Science.* 227, 375-381.
- Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., Nützmann, G., Kloas, W., Wiegand, C., 2010. The beta-receptor blocker metoprolol alters detoxification processes in the non-target organism *Dreissena polymorpha*. *Environ. Pollut.* 158, 2059– 2066.
- Cruickshank, J.M., Neil-Dwyer, G., 1985. Beta-blocker brain concentrations in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 28, 21–23.
- Daughton, C.G., 2010. Pharmaceuticals in drinking water: overview of occurrence and significance of human exposure. In: *Contaminants of emerging*

- concern in the environment: ecological and human health considerations. (R. U. Halden, Ed.) ACS Symposium Series 1048, American Chemical Society, Washington DC, pp. 9-68.
- Daughton, C.G., T.A. Ternes, 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle changes. *Environ. Health Perspect.* 107, 907–938.
 - Daughton, C.G., Ternes, T.A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change. *Environ. Health Perspect.* 107, 907– 938.
 - De Alda, M.J.L., Gil, A., Paz, E., Barcelo, D., 2002. Occurrence and analysis of estrogens and progestogens in river sediments by liquid chromatography-electrospraymass spectrometry. *Analyst* 127, 1299-1304.
 - De Almeida, E.A., Bainy A.C.D., 2006. Effects of aerial exposure on antioxidant defenses in the brown mussel *Perna perna*. *Braz Arch Biol Technol.* 49, 225-229.
 - De Pedro, N., Pinillos, M.L., Valenciano, A.I., Alonso-Bedate, M., Delgado, M.J., 1998. Inhibitory effect of serotonin on feeding behavior in goldfish: involvement of CRF. *Peptides* 19, 505–511.
 - De Zoysa, M., Pushpamali WA, Oh C, Whang I, Kim SJ, Lee J., 2008. Transcriptional upregulation of disk abalone selenium-dependent glutathione peroxidase by H₂O₂ oxidative stress and *Vibrio alginolyticus* bacterial infection. *Fish Shellfish Immun.* 25, 446-457.
 - Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Waldock, M., 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1549–1558.
 - Di Giulio, R.T., Washburn PC, Wenning RJ, Winston GW, Jewell C.S., 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Envir Toxicol Chem.* 8, 1103–1123.
 - Dondero F, Dagnino A, Jonsson H, Capri F, Gastaldi L, Viarengo A., 2006. Assessing the occurrence of a stress syndrome in mussels (*Mytilus edulis*) using

- a combined biomarker/gene expression approach. *Aquat Toxicol.* 78, Suppl 1, 13-24.
- Dorne, J.L.C.M., A.M.J. Ragas, G.K. Frampton, D.S. Spurgeon, D.F. Lewis., 2007. Trends in human risk assessment of pharmaceuticals, *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1167–1172.
 - Doyen, P., Bigot A, Vasseur P, Rodius F., 2008. Molecular cloning and expression study of pi-class glutathione S-transferase (pi-GST) and selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) transcripts in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 147, 69-77.
 - Doyen, P., Vasseur P, Rodius F., 2006. Identification, sequencing and expression of selenium-dependent glutathione peroxidase transcript in the freshwater bivalve *Unio tumidus* exposed to Aroclor 1254. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 144,122-129.
 - Droge, W., Schulze-Osthoff K, Mihm S, Galter D, Schenk H, Eck HP, Roth S, Gmunder H., 1994. Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *14*,1131-1138.
 - Elferink, J.G., de Koster B.M., 1991. Glutathione-induced enhancement of neutrophil locomotion. *184*(1), 25-36.
 - Enick, O.V., Moore, M.M., 2007. Assessing the assessments: pharmaceuticals in the environment. *Environ. Impact Assess. Rev.* 27 (8), 707–729.
 - Esterbauer, H., 1985. Lipid peroxidation products: formation, chemical properties and biological activities. In: Pli, G., Cheeseman, K.H., Dianzani, M.U., Slater, T.F. (Eds.), *Free Radicals in Liver Injury*. IRL Press, Oxford, pp. 29–47.
 - Fent, K., A.A. Weston, D. Caminada., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals, *Aquat. Toxicol.* 76, 122–159.

- Filby, A.L., Thorpe, K.L., Maack, G., Tyler, C.R., 2007. Gene expression profiles revealing the mechanisms of anti-androgen- and estrogen-induced feminization in fish. *Aquatic Toxicology* 81, 219-231.
- Fitzpatrick, P.J., D. Sheenan, D.R. Livingstone., 1995. Studies on Isoenzymes of Glutathione S-transferase in the Digestive Gland of *Mytilus Galloprovincialis* With Exposure to Pollution, *Marine Environmental Research*, **39**, 241-244
- Focazio, M.J., D.W. Kolpin, K.K. Barnes, E.T. Furlong, M.T. Meyer, S.D. Zaugg, L.B. Barber, M.E., Thurman, 2008. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States—II) Untreated drinking water sources, *Sci. Total Environ.* 402, 201–216.
- Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Capuzzo, A., Fabbri, E., 2011. The β -blocker propranolol affects cAMP-dependent signaling and induces the stress response in Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 101(2), 299-308.
- Gagnè, F., Blaise, C., André, C., Gagnon, C., Salazar, M., 2007. Neuroendocrine disruption and health effects in *Elliptio complanata* mussels exposed to aeration lagoons for wastewater treatment. *Chemosphere* 68, 731–743.
- Galloway, T.S., Depledge M.H., 2001. Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology*. 10, 5-23.
- Garrison, A.W., J.D. Pope, F.R. Allen., 1976. GC/MS analysis of organic compounds in domestic wastewaters, in: C.H. Keith (Ed.), *Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water*, Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, MI, pp. 517–556.
- Glassmeyer, S.T., D.W. Kolpin, E.T. Furlong, M.J. Focazio., 2008. Environmental presence and persistence of pharmaceuticals: an overview, in: D.S. Aga (Ed.), *Fate of Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Systems*, CRC Press, Taylor and Francis, pp. 3–52.
- Glassmeyer, S.T., E.H. Hinchey, S.E. Boehme, C.G. Daughton, I.S. Ruhoy, O. Conerly, R.L. Daniels, L. Lauer, M. McCarthy, T.G. Nettesheim, K. Sykes, V.G.

- Thompson., 2009. Disposal practises for unwanted residential medications in the United States, *Environ. Int.* 35, 566–572.
- Goeptar, A.R., Scheerens, H., Vermeulen, N.P.E., 1995. Oxygen reductase and substrate reductase activity of cytochrome P450. *Crit. Rev. Toxicol.* 25, 25-65.
 - Goldberg, E.D., Koide, M., Hodge, V., Flegal, A.R., Martin, J., 1983. U.S. Mussel Watch: results on trace metals and radionucleides. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 16, 69–93.
 - Gomez, M.J., M.J. Martinez Bueno, S. Lacorte, A.R. Fernandez-Alba, A. Aguera., 2007. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast, *Chemosphere.* 66, 993–1002.
 - Grinberg, A.V., Hannemann, F., Schiffler, B., Muller, J., Heinemann, U., Bernhardt, R., 2000. Adrenodoxin: structure, stability, and electron transfer properties. *Proteins* 40, 590–612.
 - Guemouri, L., Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G., 1991. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem.* 37, 1932-1937.
 - Halford, J.C., Harrold, J.A., Boyland, E.J., Lawton, C.L., Blundell, J.E., 2007. Serotonergic drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Drugs* 67, 27–55
 - Halling-Sorensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Luthoft, H.C., Jorgensen, S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment a review. *Chemosphere* 36, 357–393
 - Halling-Sorensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Luthoft, H.C., Jorgensen, S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment a review. *Chemosphere* 36, 357–393.

- Halling-Sorensen, B., S. Nors Nielsen, P.F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C. Holten Lutzhoft, S.E. Jorgensen.,1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment a review, *Chemosphere*. 36,357–393.
- Han, G.H., Hur, H.G., Kim, S.D., 2006. Ecotoxicological risk of pharmaceuticals from waste water in Korea: occurrence and toxicity to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 25 (1), 265–271.
- Hartke, K., Mutschler, E., 1993. *Deutsches Arzneibuch DAB 10-Kommentar*, 10th ed., vols. II and III, 3rd supplement. Deutscher Apotheker-Verlag, Stuttgart. 23, 134-156.
- Heberer, T., Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data, *Toxicol. Lett.* 131 (2002) ,5–17.
- Hignite, C., D.L. Azarnoff., 1977. Drugs and drugs metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent, *Life Sci.* 20, 337–341.
- Huggett, D.B., Khan, I.A., Foran, C.M., Schlenk, D., 2003. Determination of betaadrenergi receptor blocking pharmaceuticals in United States wastewater effluent. *Environ. Pollut.* 121, 199–205.
- Huschek, G., Hansen, P.D., Maurer, H.H., Krengel, D., Kayser, A., 2004. Environmental risk assessment of medicinal products for human use according to European Commission recommendations. *Environ. Toxicol.* 19, 226–240.
- Jo, P.G., Choi YK, Choi C.Y., 2008. Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.* 147(4) ,460-469.
- Johnson, A.C., Keller, V., Williams, R.J., Young, A., 2007. A practical demonstration in modelling diclofenac and propranolol river water concentrations using a GIS hydrology model in a rural UK catchment. *Environ. Pollut.* 146, 155–165.

- Johnson, A.C., Williams, R.J., Matthiessen, P., 2006. The potential steroid hormone contribution of farm animals to freshwaters, the United Kingdom as a case study. *Sci. Total Environ.* 362, 166–178.
- Johnson, P., 2002. Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 133, 493-505.
- Jones, O.A., Voulvoulis, N., Lester, J.N., 2002. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Res.* 36, 5013–5022.
- Kah, O., Chambolle, P., 1983. Serotonin in the brain of the goldfish. *Carassius auratus*. An immunocytochemical study. *Cell Tissue Res.* 234, 319–333.
- Kashiwagi, A., Kashiwagi K, Takase M, Hanada H, Nakamura M., 1997. Comparison of catalase in diploid and haploid *Rana rugosa* using heat and chemical inactivation techniques: postembryonic reprogramming of gene expression in amphibian and insect cells. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 11B, 499-503.
- Kawasaki, L., Aguirre J., 2001. Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology.* 183(4), 1434-1440.
- Kay, P., Blackwell, P.A., Boxall, A.B., 2005. A lysimeter experiment to investigate the leaching of veterinary antibiotics through a clay soil and comparison with field data. *Environ. Pollut.* 134, 333–341.
- Kay, P., P.A. Blackwell, A.B.A. Boxall., 2005. Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land, *Chemosphere.* 59, 951–959.
- Keen, J.H., W. B. Jakoby., 1978. Glutathione transferases, *Journal of Biological Chemistry*, 253, 5654 – 5657.
- Kemper, N., 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment, *Ecol. Indic.* 8, 1–13.

- Ken, C.F., Lin CT, Wu JL, Shaw JF., 2000. Cloning and Expression of a cDNA coding for catalase from zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(6), 2092-2096.
- Khessiba, A., Hoarau, P., Gnassia-Barelli, M., Aïssa, P., Roméo, M., 2001. Biochemical response of the mussel *Mytilus galloprovincialis* from Bizerta (Tunisia) to chemical pollutant exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 4, 222–229.
- Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak, R.W. Flick., 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 8897–8901.
- Kim, F.J., Kim HP, Hah YC, Roe J.H., 1996. Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*. *Eur J Biochem.* 241, 178-185.
- Kloas, W., Urbatzka, R., Opitz, R., Wurtz, S., Behrends, T., Hermelink, B., Hofmann, F., Jagnytch, O., Kroupova, H., Lorenz, C., Neumann, N., Pietsch, C., Trubiroha, A., Van Ballegooy, C., Wiedemann, C., Lutz, I., 2009. Endocrine Disruption in aquatic ambient. 34, 236-250.
- Khodursky AB, Bernstein J.A., 2003. Life after transcription--revisiting the fate of messenger RNA. *Trends Genet.* 3, 113-115
- Kolpin, D.W., E.T. Furlong, M.T. Meyer, E.M. Thurman, S.D. Zaugg, L.B. Barber, H.T., Buxton., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance, *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic

- wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211.
- Koutsouba, V., Th. Heberer, B., Fuhrmann, K., Schmidt-Baumler, D., Tsipi, A. Hiskia., 2003. Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography-mass spectrometry, *Chemosphere*. 51, 69–75.
 - Kummerer, K., 2001. Introduction: pharmaceuticals in the environment, in: K. Kummerer (Ed.), *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*, Springer, Berlin. pp. 1–8.
 - Kwon, J.W., Armbrust, K.L., 2006. Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2561–2568
 - Lalumera, G.M., D., Calamari, P., Galli, S., Castiglioni, G., Crosa, R., Fanelli., 2004. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy, *Chemosphere* 54,, 661–668.
 - Lam, D.D., Heisler, L.K., 2007. Serotonin and energy balance: molecular mechanisms and implications for type 2 diabetes. *Expert Rev. Mol. Med.* 9, 1–24.
 - Larsson, D.J.G., C., Pedro, N., Paxeus., 2007. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals, *J. Hazard. Mater.* 148, 751–755.
 - Le, T.X., Y., Munekage., 2004. Residues of selected antibiotics in water and mud from shrimp ponds in mangrove areas in Viet Nam, *Marine Pollut. Bull.* 49, 922–929.
 - Lee, H.B., T.E., Peart, M.L. Svoboda., 2005. Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr.* 1094, 122–129.
 - Li, C.H., Ni D.J., Song L.S., Zhao J.M., Zhang H, Li L., 2008. Molecular cloning and characterization of a catalase gene from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Fish & Shellfish Immunology*. 24(1), 26-34.

- Li, D., M. Yang, J. Hu., Y. Zhang, H., Chang, F., Jin., 2008. Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river, *Water Res.* 42, 307–317.
- Lin, A.Y.C., Y.-T. Tsai., 2009. Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities, *Sci. Total Environ.* 407, 3793–3802.
- Livingstone, D.R., 1993. Biotechnology and pollution monitoring. Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J Chem Technol Biotechnol* 57, 195–211
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Poll. Bull.* 42(8), 656-666.
- Loos, R., J. Wollgast, T., Huber, G., Hanke., 2007. Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy, *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1469–1478.
- Mackay, M., Bewley, G.C., 1989. The genetics of catalase in *Drosophila melanogaster*: isolation and characterization of acatalasemic mutants *Genetics*. 122(3), 643-52.
- Malhotra, J.D., Kaufman R.J., 2007. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword. *Antioxid Redox Sign.* 9, 2277-2293.
- Manduzio, H., Monsinjon T, Galap C, Leboulenger F, Rocher B., 2004. Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquatic Toxicology*. 70(1), 83-93.
- Mannervik, B., U., H., Danielson., 1988. Glutathione transferases – structure and catalytic activity; *CRC Critical reviews in Biochemistry*, **23**, 283 – 337.

- Martin-Diaz, M.L., Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Capuzzo, A., Fabbri, E., 2009. Effects of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarkers and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 94, 177–185.
- Maurer, M., Escher, B.I., Richle, P., Schaffner, C., Alder, A.C., 2007. Elimination of beta-blockers in sewage treatment plants. *Water Res.* 41 (7), 1614–1622.
- McClung, C.R., 1997. Regulation of catalases in Arabidopsis. *Free Radical Biology and Medicine.* 23(3), 489-496.
- Metcalfe, C.D., Chu, S., Judt, C., Li, H., Oakes, K.D., Servos, M.R., Andrews, D.M., 2010. Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 79–89.
- Mills, G.C., 1957. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem.* 229, 189-197.
- Møller, I.M., 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52, 561-591.
- Moore, M.N., Allen, J.I., McVeigh, A., 2006. Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Mar. Environ. Res.* 61, 278–304.
- Mu, C.K., Ni DJ, Zhao JM, Wang L.L., Song L.S., Li, L., 2010. cDNA cloning and mRNA expression of a selenium-dependent glutathione peroxidase from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol.* 157, 168-180.
- Nakamura, H., Nakamura K, Yodoi J., 1997. Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol.* 15,351-369.

- Nordberg, J., Arnér E.S.J., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*. 31(11), 1287-1312.
- Oaks, J.L., Gilbert, M., Virani, M.Z., Watson, R.T., Meteyer, C.U., Rideout, B.A., Shivaprasad, H.L., Ahmed, S., Chaudhry, M.J., Arshad, M., Mahmood, S., Ali, A., Khan, A.A., 2004. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* 427, 630–633.
- Okado-Matsumoto, A., Fridovich I., 2001. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu, Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem*. 276, 38388-38393.
- Parolini, M., Binelli A, Cogni D, Provini A., 2010. Multi-biomarker approach for the valuation of the cyto-genotoxicity of paracetamol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere*. 79, 489-498.
- Persson, M., E. Sabelstrom, B., Gunnarsson., 2009. Handling of unused prescription drugs—knowledge, behaviour and attitude among Swedish people, *Environ. Int.* 35, 771–774.
- Pery, A.R.R., M. Gust, B. Vollat, R. Mons, M. Ramil, G. Fink, T. Ternes, J. Garric., 2008. Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates, *Chemosphere*. 73, 300–304.
- Pfluger, P., D.R. Dietrich., 2001. Effects on pharmaceuticals in the environment an overview and principle considerations, in: K. Kummerer (Ed.), *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*, Springer, Berlin. pp. 11–17.
- Phillips, D.J.H., Segar D.A., 1986. Use of bioindicators in monitoring conservative contaminants: programme design imperatives. *Mar Pollut Bull*. 17,10–17
- Regoli, F., Principato G., 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology*. 31(2), 143-164.

- Richardson, M.L., Bowron, J.M., 1985. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *J. Pharm. Pharmacol.* 37, 1–12.
- Richardson, M.L., J.M. Bowron., 1985. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment, *J. Pharm. Pharmacol.* 37, 1–12.
- Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G.C., Waldock, M., Sumpter, J.P., 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1559–1565.
- Ruckpaul, K., Rein, H., Blanck, J., 1989. Regulation mechanism of the activity of the hepatic endoplasmic cytochrome P-450. In: Ruckpaul, K., Rein, H. (Eds.), *Basis and Mechanism of Regulation of Cytochrome P450*, 1. Akademie-Verlag, Berlin, pp. 1–55.
- Sacher, F., F.T. Lange, H.-J. Brauch, I. Blankenhorn., 2001. Pharmaceuticals in groundwaters. Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Wurttemberg, Germany. *J. Chromatogr. A* 938, 199–210.
- Santos, L.H., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 175, 45–95.
- Schrader M, Fahimi H.D., 2006. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*.1763(12), 1755-1766.
- Schreck, R., Rieber, P., Baeuerle P.A., 1991. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10, 2247-2258.
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., Negele, R.D., 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac Part I. Histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 68, 141–150.
- Serfass, R.E., Ganther H.E., 1975. Defective microbicidal activity in glutathione peroxidase- deficient neutrophils of selenium-deficient rats. *Nature.* 255, 640-641.

- Shugart, L.R., 1995. Environmental genotoxicology. In: Rand, G.M. (Ed.), Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment. Taylor & Francis, Bristol, PA, pp. 405-420.
- Siu, W.H.L., Cao, J., Jack, R.W., Wu, R.S.S., Richardson, B.J., Xu, L., Lam, P.K.S., 2004. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). Aquat. Toxicol. 66, 381-392.
- Solé, M., Shaw, J.P., Frickers, P.E., Readman, J.W., Hutchinson, T.H., 2010. Effects of feeding rate and biomarker responses of marine mussels experimentally exposed to propranolol and acetaminophen. Anal. Bioanal. Chem. 396, 649–656.
- Srivastava, M., Kapoor, N.K., 1983. The effect of propranolol on rat-brain catecholamine biosynthesis. J. Biosci. 5, 261–266.
- Storz, G., Tartaglia L.A., 1992. OXYR: a regulator of antioxidant genes. The Journal Nutrition. 122(3), 627-630.
- Stumpf, M., T.A. Ternes, R.-D. Wilken, S.V. Rodrigues, W. Baumann., 1999. Polar drug residue in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil, Sci. Total Environ. 225, 135–141.
- Suwalsky, M., Mennickent, S., Norris, B., Villena, F., Sotomayor, C.P., 2006. Effects of the antiepileptic drug carbamazepine on human erythrocytes. Toxicol. In Vitro. 20, 1363- 1369.
- Tauxe-Wuersch, A., L.F. De Alencastro, D. Grandjean, J. Tarradellas., 2005. Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment, Water Res. 39, 1761–1772.
- Terman, A., Brunk, U.T., 2004. Lipofuscin. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 36, 1400-1404.
- Ternes, T.A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. Water Res. 32, 3245–3260.
- Timbrell, J., 2002. Principles of Biochemical Toxicology, third ed., Taylor & Francis, London. 34, 234-256.

- Topp, E., S.C. Monteiro, A. Beck, B.B. Coelho, A.B.A. Boxall, P.W. Duenk, S. Kleywegt, D.R. Lapen, M. Payne, L. Sabourin, H. Li, C.D. Metcalfe., 2008. Runoff of pharmaceuticals and personal care products following application of biosolids to an agricultural field, *Sci. Total Environ.* 39, 52–59.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullos, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotox. Environ. Safe.* 64, 178-189
- Van Der Oost, R., Vindimian, E., Van Den Brink, P.J., Satumalay, K., Heida, H., Vermeulen, N.P.E., 1997. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): III. Statistical analyses of relationships between contaminant exposure and biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 39, 45–75.
- Van Harten, J., 1993. Clinical pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Clin. Pharmacokinet.* 24, 203–220.
- Verenitch, S.S., C.J. Lowe, A. Mazumder., 2006. Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1116, 193–203.
- Viarengo, A., 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Aquat. Sci. Review* 1, 295-317.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, F., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 281–300.
- Viarengo, A., Nott, J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C, Comp. Pharmacol. Toxicol.* 104, 355-372.
- Viarengo, A., Palmero, S., Zanicchi, G., Capelli, R., Vaissiere, R., Orunesu, M., 1985b. Role of metallothioneins in Cu and Cd accumulation and elimination in the gill and digestive gland cells of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Mar. Environ. Res.* 16, 23–36.

- Vidal, M.L., P. Rouimi, L. Debrauwer, J. F. Narbonne., 2002. Purification and characterisation of glutathione S – transferases from the freshwater clam *Corbicula fluminea* (muller), *Comparative Biochemistry and physiology part c*, 131, 477 – 489.
- Vidal-Linan, L., Bellas J, Campillo JA, Beiras R. Integrated use of antioxidant enzymes in mussels., 2010. *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (NW Spain). *Chemosphere*. 78, 265-272.
- Vieno, N.M., T. Tuhkanen, L. Kronberg., 2006. Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection, *J. Chromatogr. A* 1134, 101–111.
- Vu, J., Beckwith, M.C., 2007. Central nervous system side effects of beta-adrenergic blocking agents. 23, 214-230.
- Vulliet, E., Wiest, L., Baudot, R., Grenier-Loustalot, M.F., 2008. Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 1210, 84-91.
- Wang, D.H., Ken TT, Sano KK, Masuoka N, Kira S., 2001. cDNA cloning and expression of mutant catalase from the hypocatalasemic mouse: comparison with the acatalasemic mutant. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1522(3), 217-220.
- Weigel, S., J. Kuhlmann, H. Huhnerfuss., 2002. Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea, *Sci. Total Environ*. 295, 131–141.
- Westerlund, A., 1985. Central nervous-system side-effects with hydrophilic and lipophilic beta-blockers. *Eur. J. Clin. Pharmacol*. 28, 73–76.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat Toxicol*. 19,137–161

- Witschi, A., Reddy S, Stofer B, Lauterburg B.H., 1992. The systemic availability of oral glutathione .*Eur J Clin Pharmacol*.43(6),667-669.
- Wong, D.T., Bymaster, F.P., Engleman, E.A., 1995. Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Sci*. 57, 411–441.
- Wu, C.L., Mai KS, Zhang WB, Ai QH, Xu W, Wang X.J., 2010. Molecular cloning, characterization and mRNA expression of selenium-dependent glutathione peroxidase from abalone *Haliotis discus hannai* Ino in response to dietary selenium, zinc and iron. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 152,121-132.
- Xia, K., A. Bhandari, K. Das, G. Pillar., 2005. Occurrence and fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in biosolids, *J. Environ. Qual.* 34, 91–104.
- Youn H.D, Youn H, Lee J.W., Yim Y.I, Lee J.K, Hah Y.C., 1996. Unique isozymes of superoxide dismutase in *Streptomyces griseus*. *Arch Biochem Biophys.* 334, 341-348.
- Youn, H.D., Kim EJ, Roe JH, Hah YC, Kang S.O., 1996. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem J*.318(Pt 3), 889-896.
- Z. Moldovan., 2006. Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania, *Chemosphere.* 64,1808–1817.
- Zamocky, M., Furtmüller P.G., Obin C., 2008. Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxidant & Redox Signaling.* 10(9), 1527-1548.
- Zhang, Y., Song J.M., Yuan H.M., Xu Y.Y., He Z.,P, Duan L.Q., 2010. Biomarker responses in the bivalve (*Chlamys farreri*) to exposure of the environmentally relevant concentrations of lead, mercury, copper. *Environ Toxicol Pharma.* 30, 19-25.
- Zohar, Y., Munoz-Cueto, J.A., Elizur, A., Kah, O., 2009. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 438–455.

- Zorita, I., Bilbao, E., Schad, A., Cancio, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., 2007. Tissue- and cell-specific expression of metallothionein genes in cadmium- and copper-exposed mussels analyzed by in situ hybridization and RT-PCR. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 220, 186–196.
- Zuccato, E., S. Castiglioni, R. Fanelli, G. Reitano, R. Bagnati, C. Chiabrando, F. Pomati, C. Rossetti, D. Calamari., 2006. Pharmaceuticals in the environment in Italy: causes, occurrence, effects and control, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 13, 15–21.

7.RINGRAZIAMENTI

Ed è strano pensare come una ragazza che è sempre stata attorniata dal mare e da tutto ciò che gli gira intorno, sia in qualche modo costretta a lasciare tutto per migrare in un'altra terra. Ed eccomi qua... Sembrava ieri quando ho iniziato a frequentare questo corso della magistrale in Biologia Marina, un percorso il mio un po' faticoso ma dopo tutto ce l'ho fatta. Per tutte le persone che mi sono state vicine non basterebbe scrivere un libro. Ringrazio la Prof.ssa Elena Fabbri per avermi dato la possibilità di aver fatto la tesi nel suo laboratorio. A Silvia, che con la sua bravura e pazienza mi ha insegnato tanto, mi ha seguita in ogni istante risolvendo i miei continui dubbi! Ringrazio Sara, per i suoi mille dolci e compagnia e le chiacchierate in laboratorio. In questo giorno così importante ringrazio anzitutto i miei genitori, voi le mie colonne portanti, la mia forza senza le quali non avrei mai avuto la possibilità di arrivare fin qua. A mia madre che ha sempre creduto in me, nonostante i mille problemi di salute che continuamente hanno cercato di ostacolarli. A mio padre, il prototipo di papà che tutti vorrebbero avere, che nonostante le sue sedici ore di lavoro mi ha sempre confortata in modo un po' buffo ma pur sempre saggio. A mia sorella Marta, anche se un po' svampita e con la testa perennemente tra le nuvole, c'è sempre stata. Giuseppe, il mio Ninni, la mia dolce perfetta metà, senza di te come avrei fatto? Ai miei nonni, miei secondi genitori, mia nonna che anche se da così lontano mi ha sempre confortata con le sue chiamate così attese e piene di allegria, mio nonno, il mio orgoglio ed esempio di vita. A zia Enza, la zia che anche da lontano ti riempie le giornate raccontandoti delle sue mille verdure che probabilmente non finirà mai di congelare. Dorella e Fabiola, mie cugine ma in realtà sorelle, grazie per non avermi mai abbandonata anche a 1200 km di distanza. come dimenticare i ripassoni sul mitico terrazzo di Fede, la mia cocca, amica, confidente che mi è sempre stata vicino in ogni secondo di questo piccolo ma intenso percorso, che tra

mille risate ha sempre saputo come risollevarmi su di morale! Giusy, porterò sempre con me il ricordo di una persona più buona del pane, disponibile sempre. Simonina, come scordare i 8000000000 squilli al secondo pur di farsi richiamare. Coma scordare la follia di Di Nallo, ultimamente l'appartamento si è trasformato in una centrale dell'Arte, grazie!!! Grazie a Cinzia, porterò sempre con me il ricordo delle nostre chiacchierate infinite nel corridoio con la mitica tisana della salute, Giorgioni docet! Ringrazio tutta l'allegria, pazza, scatenata compagnia di Ras Vennas, per le splendide giornate e serate passate assieme, a Claudio, Alice, Alisar, Elisa, Lisa, Aurora, Francesca, Samira , e tutti gli altri..Non scorderò mai le mille feste alla mitica P.zza Baracca n°4, con tanto di Vecchia, a Marina, Travolta, Bradipop, e il mitico Gamba7 (dove entri con una gamba e ne esci con 7). Ringrazio tutta la mia splendida comitiva di Kr, Alessandro, Federica, la mia nana, Giuseppe e Alberto, come avrei fatto senza di voi?? Ed infine ringrazio me stessa, per non essermi mai tirata indietro..andando avanti a testa alta senza mai mollare!!